

УДК 599.323.4..54..616.211-002

ВИБІР ОПТИМАЛЬНОГО ФЛОГОГЕНУ ПРИ СТВОРЕННІ МОДЕЛІ ХРОНІЧНОГО КАТАРАЛЬНОГО РИНИТУ У ЩУРІВ

Тимченко М.Д.

Державна установа „Інститут отоларингології ім.проф. О.С.Коломійченка АМН України”
e-mail: tmd@e-mail.ua

Надійшла до редакції 19.03.2010

Розглянуто можливості моделювання катарального риніту у щурів за допомогою інтраназальних інстиляцій різних флогогенів, що використовуються у фармакологічній практиці на тлі імуносупресії, індукованої циклофосфаном. Проведена термометрія слизової порожнини носа, морфологічний аналіз патологічних змін слизової порожнини носа лабораторних тварин і дослідження лейкограми периферичної крові, при використанні для індукції локального запалення інтраназальних інстиляцій декстрану, карагінану і серотоніну в різних концентраціях. Оптимальним флогогеном для індукції запалення слизової оболонки носа у щурів є 0,1%-ний розчин декстрану.

Ключові слова: катаральний риніт, моделювання, флогогени.

ВСТУП

Запальні захворювання слизової оболонки верхніх дихальних шляхів є найпоширенішими серед ЛОР-захворювань - симптоми риніту періодично відчують біля 40% населення. Хронізація запального процесу суттєво ускладнює життя пацієнтів та сприяє розвитку супутніх захворювань, зокрема, з боку серцево-судинної та імунної систем [1]. В постійному пошуку нових способів та засобів лікування актуальним є випробування їх на експериментальній моделі, де процес хронічного запалення слизової оболонки носа відтворено на лабораторних тваринах. Така модель повинна відображати процеси, які супроводжують хронізацію запалення слизової оболонки носа в клініці, бути доступною, зручною та надійною у відтворенні [2].

Флогогени хімічної природи (карагінан, серотонін, декстран), що використовуються при моделюванні запалення у тварин, відповідають цим вимогам і не потребують спеціальних умов роботи, як різноманітні інфекційні агенти [3,4]. Зважаючи на те, що хронічні риніти, зокрема, хронічний катаральний риніт (ХКР), призводить до вторинних імунodefіцитних станів (чи розгортається на фоні існуючого імунodefіциту) [5], при моделюванні цього захворювання доцільною є спроба відтворити такий стан і у дослідних тварин. Імуносупресія також широко використовується при вивченні впливу фармакологічних засобів для створення більш виразної картини різноманітних патологічних процесів [6, 7]. Як фактор, що викликає у щурів помірну імуносупресію, може використовуватися циклофосфан в дозі 40 мг/кг [8,9], введений попередньо до флогогену.

Тому метою даного фрагменту роботи при створенні експериментальної моделі ХКР було обрання флогогену та визначення його оптимальних доз застосування для відтворення місцевого запального процесу в слизовій оболонці носа дослідних щурів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проведені на 80 щурах Wistar обох статей, вагою 195-250 г.

Всім дослідним тваринам попередньо робили імуносупресію: за добу до першого застосування флогогену внутрішньоочеревинно вводили розчин циклофосфану, у 0,9 %-вому розчині хлориду натрію, концентрацією 20 мг/мл із розрахунку – 40 мг цитостатика на 1 кг маси.

Тварини були розподілені для двох етапів експериментів: першочергове завдання полягало в з'ясуванні можливості використання декстрану (6%), карагінану (1%) та серотоніну (0,005%) в якості подразнюючих речовин для відтворення запального процесу в слизовій носа в концентраціях, що звичайно застосовуються при фармакологічних дослідженнях. Цим тваринам протягом двох тижнів три дні поспіль з чотириденним інтервалом інстилювали у кожний носовий хід по 20 мкл відповідного розчину флогогену (в 0,9% NaCl). З досліду тварин виводили через тиждень після останнього введення.

Зважаючи на одержані результати, наступне завдання склав підбір зменшених концентрацій подразнюючих речовин: розчини флогогенів (0,1% та 0,01% декстран, 0,1% карагінан) інстилювали щурам у кожний носовий хід два рази по 20 мкл (по одному закапуванню раз на тиждень). З експерименту тварин

виводили через 1 місяць після останнього введення подразника.

Як флогогени застосовували декстран фірми Fluka (Швейцарія) з молекулярною масою 70 000 Да, серотоніна креатин сульфатного комплексу 1 Н₂О фірми Calbiochem (США) з молекулярною масою 405,4 Да та карагінан російського виробництва.

На початку досліду та в процесі моделювання запалення оглядали тварин, визначаючи стан їх носоглотки. Так як підвищення температури є однією з класичних ознак запалення, паралельно проводили вимірювання загальної (ректально) та локальної (слизової оболонки обох носових проходів, з визначенням середнього значення) температури за допомогою каліброваної термометри.

Наприкінці досліду визначали основні параметри лейкограми периферичної крові дослідних тварин, як один з інтегруючих загальних показників стану організму: визначали загальну кількість лейкоцитів в камері Горяєва, лейкоцитарну формулу підраховували шляхом мікроскопії мазків, пофарбованих за Паппенгеймом [10].

Виявляючи особливості розвитку місцевого запального процесу, проводили морфологічний аналіз слизової оболонки носа: у дослідних і контрольних тварин досліджували цитоархітекtonіку респіраторного епітелію, особливості стану системи мікроциркуляції, функціональну активність келихоподібних клітин і залозистих утворень [11,12].

Контролем для обох серій досліджень були 15 щурів, яким проводили імуносупресію, але не інстилювали флогогени.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили, використовуючи непараметричний критерій U Вілкоксона-Манна-Уїтні та парний критерій t Стьюдента [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час огляду тварин виявлено, що інстиляції у ніс 6%-вого розчинів декстрану, 1%-вого розчину карагінану або 0,005%-вого розчину серотоніну спричинюють значне утруднення носового дихання, гіперемію слизової оболонки носа, появу на ній слизу та підвищення загальної температури тіла в середньому на 3,0°.

За даними гематологічних досліджень (табл. 1), у щурів, яким закапували розчини 6%-вого декстрану, 1%-вого карагінану та 0,005% серотоніну спостерігається достовірно ($P_U < 0,05$) зростання абсолютної кількості сегментоядерних нейтрофільних гранулоцитів, приріст абсолютного вмісту еозинофілів при застосуванні декстрану та карагінану, значне збільшення вмісту моноцитів при використанні 1% карагінану, деяке збільшення ($P_U > 0,05$) загальної кількості лейкоцитів крові.

Зростання кількості еозинофілів у крові під впливом декстрану та карагінану може бути пов'язане з розвитком сенсibiliзації тварин до цих препаратів, або з поширенням та поглибленням запального процесу [14]. Тому для відтворення катарального запалення слизової носа бажано послабити антигенне навантаження шляхом зниження дози введенного флогогену, застосовуючи менші концентрації, ніж ті, що використовуються при індукції запалення у задній кінцівці дрібних лабораторних тварин. Про це свідчать результати і морфологічних досліджень.

Порівняно з контролем (рис. 1), морфологічний аналіз слизової оболонки порожнини носа щурів, яким ендоназально наносили 6%-вий розчин декстрану, виявив значну кількість слизового секрету на поверхні миготливого епітелію, порушення анізотропності, гіперфункцію епітеліальних тканин, гіперемію дрібних кровоносних судин, тучноклітинну реакцію в більш глибоких шарах слизової оболонки. (рис. 2).

У тварин, яким проводили ендоназальні інстиляції 1%-вого розчину карагінану, на поверхні епітелію фіксувалась значна кількість слизових скупчень, виявлялись гіперфункція та дегенерація великої кількості келихоподібних клітин, базальна мембрана була суттєво потовщена. Значні зміни виникали в структурі залозистих утворень: різкі розширення просвітів, дегенерація клітин залозистого епітелію. Вогнищево спостерігались тучні клітини, деякі з них знаходились на різних стадіях дегрануляції. Серед структур власного шару розвивались дрібні та поширені крововиливи на фоні дифузної гіперемії (рис. 3).

Нанесення щурам на слизову оболонку носової порожнини 0,005%-вого розчину серотоніну супроводжувалось посиленою секрецією келихоподібних клітин та залозистих утворень, без змін їх структурної характеристики. Визначалось значне підвищення проникності дрібних кровоносних судин, потовщення слизової оболонки та вогнищевий розвиток обмежених крововиливів (рис. 4).

Клінічне обстеження тварин, яким ендоназально вводили зменшені концентрації флогогенів (0,1% та 0,01% декстран, 0,1% карагінан) показало, що через 1 місяць після останньої інстиляції флогогенів у щурів цих груп виявлялись зовнішні ознаки риніту, які супроводжувались підвищенням (в середньому, на 2,5°C), відносно вихідних значень, як локальної температури слизової оболонки носа, так і загальної температури (табл.2).

Зменшені дози подразнюючих речовин не спричинювали достовірних змін у лейкоцитарному складі крові (табл. 3), що, на наш погляд, може розглядатись як ознака того, що запалення носить локальний характер.

Патологічні зміни в слизовій оболонці носа тварин цих дослідних груп визначають і

Таблиця 1.

Лейкоцитарний склад крові щурів з експериментальним ринітом на тлі індукованого імунодефіциту при застосуванні розчинів флогогенів у концентраціях, загальноприйнятих при проведенні фармакологічних досліджень протизапальної дії препаратів

| Показник | Дослідні групи | | | |
|--|--------------------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | Контрольна група | Тварини з експериментальним ринітом | | |
| | | 6 %-вий розчин декстрану | 1 %-вий розчин карагінану | 0,005 %-вий розчин серотоніну |
| | СЗ (МК) | СЗ (МК) | СЗ (МК) | СЗ (МК) |
| n=15 | n=6 | n=6 | n=6 | |
| Загальний вміст лейкоцитів, $\cdot 10^9$ кл/л | 8,10 3,30-13,70 | 11,17 8,80-13,60 | 10,27 10,00-10,60 | 8,93 8,00-9,40 |
| Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити, $\cdot 10^9$ кл/л | 0,13 0-0,29 | 0,15 0,13-0,17 | 0,19 0-0,37 | 0,24 0,12-0,42 |
| Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити, $\cdot 10^9$ кл/л | 2,27 1,01-3,78 | 5,04* 3,39-8,30 | 3,34* 3,11-3,71 | 3,71* 3,08-4,61 |
| Еозинофільні гранулоцити, 10^9 кл/л | 0,37 0,09-0,90 | 0,89* 0,34-1,28 | 0,93* 0,50-1,64 | 0,75 0,08-1,22 |
| Моноцити, 10^9 кл/л | 0,20 0-0,73 | 0,34 0,09-0,61 | 0,71* 0,51-1,05 | 0,33 0,08-0,66 |
| Лімфоцити, $\cdot 10^9$ кл/л | 5,12 2,26-9,52 | 4,75 4,14-5,88 | 4,98 4,29-5,71 | 3,91 3,43-4,64 |
| Великі гранулоцитарні лімфоцити, $\cdot 10^9$ кл/л | 0,08 0-0,45 | 0,12 0-0,22 | 0,05 0-0,15 | 0,07 0,05-0,09 |

Примітки: 1. СЗ – середні значення; 2. МК – межі коливань; 3. n – кількість тварин; 4. * - достовірність розбіжностей відносно контролю $p_U < 0,05$.

Таблиця 2.

Вплив дворазової інстиляції розчинів різних флогогенів у зменшених концентраціях на загальну температуру та температуру слизової оболонки носа у щурів через 1 місяць після індукції риніту.

| Розчин флогогену | 0,01 %-вий розчин декстрану | 0,1 %-вий розчин декстрану | 0,1 %-вий розчин карагінану |
|--|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | СЗ (МК) | СЗ (МК) | СЗ (МК) |
| | n=7 | n=8 | n=7 |
| Загальна $t^{\circ}C$ (початок дослідження) | 32,6 31,0-34,0 | 32,1 30,8-33,2 | 32,4 30,2-33,8 |
| Загальна $t^{\circ}C$ (наприкінці дослідження) | 34,7* 31,0-36,0 | 34,8* 34,2-35,6 | 35,0* 33,0-36,8 |
| Температура CO носа (початок дослідження) | 29,9 26,8-33,8 | 28,2 26,0-31,6 | 28,7 26,1-30,2 |
| Температура CO носа (наприкінці дослідження) | 31,7* 29,8-34,2 | 31,9* 30,8-33,1 | 31,0* 30,0-33,4 |

Примітки: 1. СЗ – середні значення; 2. МК – межі коливань; 3. n – кількість дослідних тварин; 4. * – достовірність розбіжностей з вихідними даними, $p_U < 0,05$.

Таблиця 3.

Лейкоцитарний склад крові щурів з експериментальним ринітом, обумовленим дією флогогенів у зменшених концентраціях

| Показник | Дослідні групи | | | |
|---|--------------------|---|----------------------------|-----------------------------|
| | Контрольна група | Тварини з ринітом, обумовленим різними флогогенами, | | |
| | | 0,01 %-вий розчин декстрану | 0,1 %-вий розчин декстрану | 0,1 %-вий розчин карагінану |
| | СЗ (МК) | СЗ (МК) | СЗ (МК) | СЗ (МК) |
| n=15 | n=10 | n=10 | N=9 | |
| Загальний вміст лейкоцитів, 10 ⁹ кл/л | 8,10 3,30-13,70 | 7,38 4,00-9,70 | 7,97 4,60-15,00 | 7,23 4,80-10,30 |
| Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити, 10 ⁹ кл/л | 0,13 0-0,29 | 0,11 0-0,24 | 0,13 0,02-0,39 | 0,12 0-0,23 |
| Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити, 10 ⁹ кл/л | 2,27 1,01-3,78 | 2,18 0,94-3,40 | 2,57 1,10-7,58 | 2,27 1,29-3,67 |
| Еозинофільні гранулоцити, 10 ⁹ кл/л | 0,37 0,09-0,90 | 0,49 0,08-0,79 | 0,34 0,09-0,62 | 0,34 0,19-0,58 |
| Моноцити, 10 ⁹ кл/л | 0,20 0-0,73 | 0,20 0,04-0,44 | 0,21 0,03-0,52 | 0,22 0,10-0,46 |
| Лімфоцити, 10 ⁹ кл/л | 5,12 2,26-9,52 | 4,51 2,22-6,05 | 4,80 2,83-7,67 | 4,26 2,59-6,23 |
| Великі гранулоцитарні лімфоцити, 10 ⁹ кл/л | 0,08 0-0,45 | 0,12 0-0,32 | 0,04 0-0,16 | 0,14 0,02-0,33 |

Примітки: 1. СЗ – середні значення; 2. МК – межі коливань; 3. n – кількість тварин; 4. * - достовірність розбіжностей відносно контролю $p_U < 0,05$.

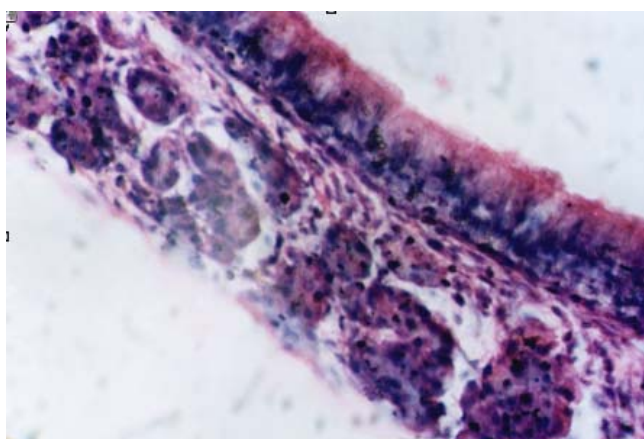


Рис. 1. Фрагмент препарату слизової оболонки порожнини носа контрольного щура. Поверхневий війчастий епітелій з помірно активованими келихоподібними клітинами. Субепітеліально волокниста сполучна тканина, дрібні кровоносні судини та часточки ацинарних відділів слизових залоз. Фарбування гематоксилин-еозином. Мікрофото. Зб. 200.

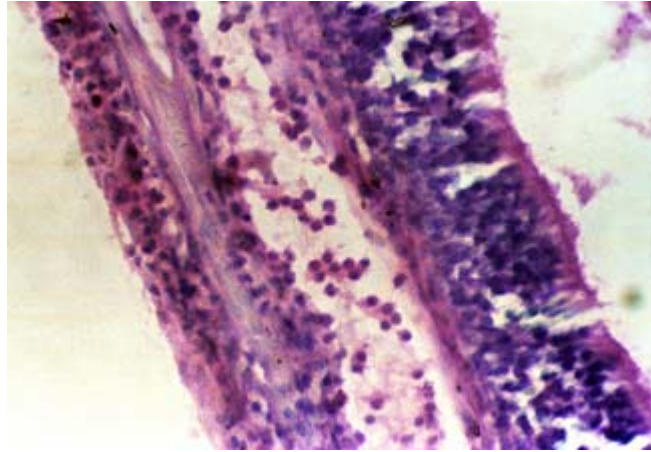


Рис. 2. Фрагмент препарату слизової оболонки порожнини носа щура з індукованим імунодефіцитом, якому ендоназально наносили 6% розчин декстрану. Порухнення анізотропності клітин війчастого епітелію, наявність слизового секрету на його поверхні. Значна кількість еозинофілів в розширеному просвіті кровоносної судини. Фарбування гематоксилин-еозином. Мікрофото. Зб. 250.

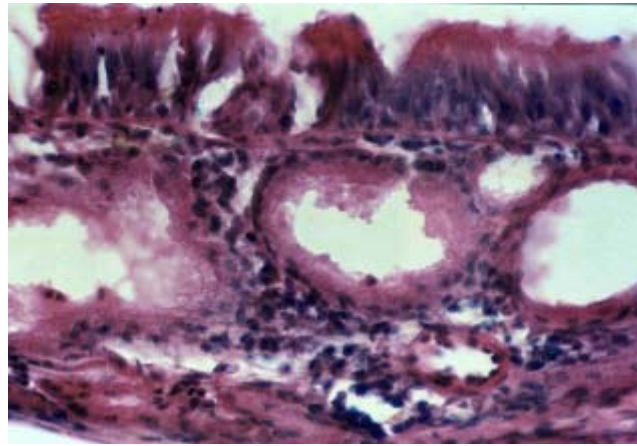


Рис. 3. Фрагмент препарату слизової оболонки порожнини носа щура з індукованим імунодефіцитом, якому ендоназально наносили 1% розчин карагану. Велика кількість слизового секрету на поверхні епітелію, дегенеративні зміни келихоподібних клітин, різко розширені просвіти вивідних протоків з наявністю слизового вмісту, зліва – крововилив. Фарбування гематоксилин-еозином. Мікрофото. Зб. 250.

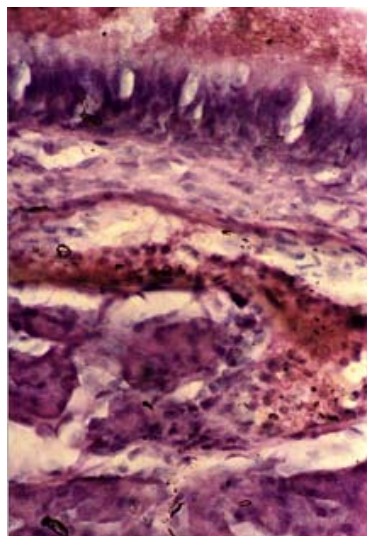


Рис. 4. Фрагмент препарату слизової оболонки порожнини носа щура з індукованим імунодефіцитом, якому ендоназально наносили 0,005% розчин серотоніну. Розширені келихоподібні клітини. Дифузний периваскулярний набряк. Крововилив у власному шарі слизової оболонки. Ацинарні відділи залозистих часточок. Фарбування гематоксилин-еозином. Мікрофото. Зб. 250.

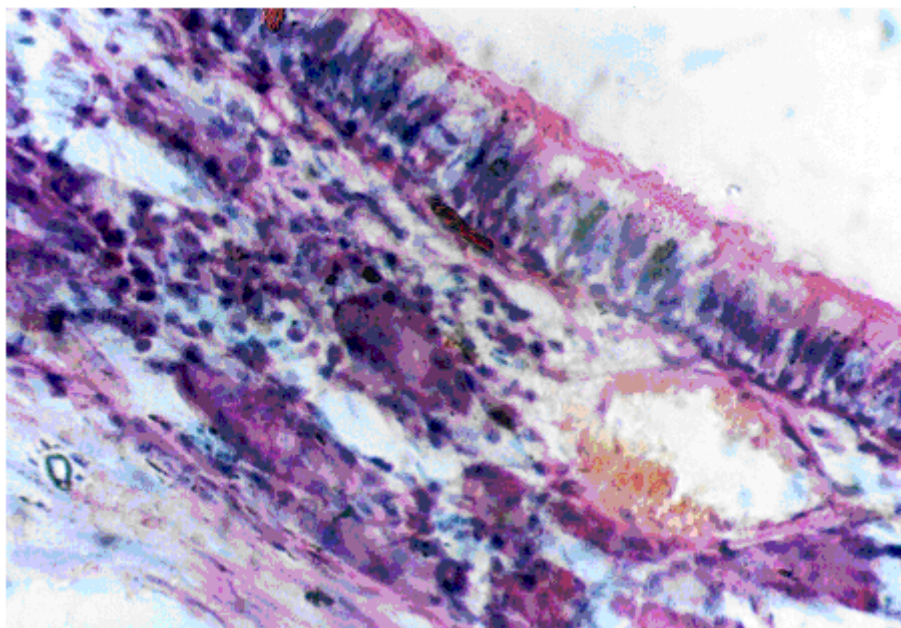


Рис. 5. Фрагмент препарату слизової оболонки порожнини носа щура з індукованим імунodefіцитом, якому ендоназально наносили 0,1% розчин декстрану.

Склеювання війок на поверхні епітелію, зміна анізотропності епітеліальних тканин. Гіперемія кровоносних судин власного шару, пристінковий стаз. Помірний периваскулярний набряк, клітини інфільтрата та помірна активація залозистих утворень. Фарбування гематоксилин-еозином. Мікрофото. Зб. 200.

морфологічно характеризують наявність катарального риніту. Найбільш чіткими ці зміни були у щурів, яким інстилювали 0,1 %-вий розчин декстрану: спостерігалось суттєве потовщення слизової оболонки на всьому її протязі, в 2-3 рази більше, ніж у тварин контрольної групи. В частині клітин миготливого епітелію розвивались дистрофічні зміни, які супроводжувались набряком та склеюванням війок, що свідчить про зменшення рухливості останніх. Подекуди відмічалась активація келихоподібних клітин та виявлялись порушення типової анізотропності епітелію, внаслідок інфільтрації його структур. Субепітеліально та серед компонентів власного шару слизової оболонки знаходились дрібні кровоносні судини із розширеними просвітами. У деяких з них спостерігався пристінковий стаз формених елементів крові. Місцями розвивався помірний периваскулярний набряк в зоні якого знаходились клітини інфільтрата, що виявлялись також поблизу ацинарних відділів слизових залоз. В просвітах залозистих утворень та їх вивідних протоках визначалась значна кількість слизового секрету (рис. 5).

Сумарна оцінка візуальних спостережень, гематологічного та морфологічного аналізу дозволяє остаточно визначитися з вибором флогогену для подальшого моделювання хронічного катарального риніту на користь декстрану в 0,1% концентрації – зміни слизової виразні, наявні типові ознаки катарального запалення [15], але, в той самий час, відтворене запалення має локальний характер.

ВИСНОВКИ

1. Для індукції запалення слизової оболонки носа у щурів концентрацію розчинів флогогенів, що інстилюються у ніс тваринам, необхідно зменшувати, порівняно із загальноновживаною при фармакологічних дослідженнях.

2. Найбільш адекватним подразником при відтворенні експериментального катарального риніту є 0,1 %-вий розчин декстрану з молекулярною масою 70 000 Да.

3. Для відтворення в слизовій облонці носової порожнини щурів запалення, яке за морфологічними ознаками адекватне катаральному риніту і зберігається протягом 1 міс після його індукції, необхідно через добу після введення тваринам циклофосфану, два рази з інтервалом один тиждень проводити інтраназальну інстиляцію 0,1%-вого розчину декстрану по 20 мкл у обидва носових ходи.

Література

1. Пальчун В. Т. Оториноларингология / В. Т. Пальчун, М. М. Магомедов // М.: ГЭОТАР-МЕД. — 2008 г. — 656 с.
2. Заболотний Д.І., Мельников О.Ф., Тимченко М.Д., Тимченко С.В. Модель хронічного катарального риніта (Повідомлення 1). Теоретичні обґрунтування підходів до створення експериментальної моделі катарального риніта // Ринологія. - 2005. - №3. - С.3-6.
3. Тринус Ф.П., Мохорт П.А., Клебанов Б.М. Нестероидные противовоспалительные средства. - Киев: Здоров'я, 1975. - 240 с.
4. Rhinitis: Immunopathology and pharmacotherapy /Ed. Raeburn D., Gjembyg M.A. - Basel.: Birkhauser, 1997. - 234 p.

5. Иммунодефицитные состояния / Под ред. В.С.Смирнова и И.С.Фрейдлина.- СПб.: Фолиант, 2000.- 568 с
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, Федеральное государственное учреждение "Научный центр экспертизы средств медицинского применения". - Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. - Москва: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - 832 с.
7. Руководство по иммунофармакологии. Пер. с англ./Под ред. М. М. Дейла и Дж. К. Формана. — М.: Медицина, 1998. - 332 с.
8. Мельников О.Ф., Красий Р.И., Кривохатская Л.Д. Экспериментальная модель дефицита нормальных цитотоксических клеток в периферической крови // VII съезд онкологов УССР (Симферополь, 2-4 окт. 1985 г.): Тез. докл.- К.: Б.и., 1985. - С.356-358.
9. Мельников О.Ф., Красий Р.И., Опанащенко Г.А. Клинико-экспериментальное обоснование применения иммуномодуляторов при коррекции недостаточности ЕК-активности // IV Всесоюз. Симпозиум "Регуляция иммунного гомеостаза" (Суздаль, 5-7 мая 1986 г.): Тез. докл.- Л.: Б.и., 1986. - С.50-51.
10. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике /Под ред. проф. М.А. Базарновой, проф. В.Т. Морозовой. - К.: Выща шк. Головное изд-во, 1988.- 318 с.
11. Ahlgvist Y. Methyl green-pyronin staining: effects of fixation, use in routine pathology // Stain Technol.- 1972.- Vol.47, N1.- P.17-22.,
12. Iseri S., Mori T. Methyl green-pyronin stain distinguishes proliferation from differentiated nonproliferating cell nuclei after acid denaturation of DNA//J.Histochem. a. Cytochem.- 1986.- Vol.34, N5.- P.682-687.
13. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов.- Л.: Медицина, 1978. - 296 с.
14. Островский В.К., Мащенко А.В., Янголенко Д.В., Макаров С.В. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях // Клини. лаб. диагностика. - 2006. - № 6. - С. 50-53.
15. Быкова В.П. Итоги и перспективы морфологического изучения заболеваний ЛОР-органов // Российская оториноларингология. – 2002. - №1. – С.30-32.

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО ФЛОГОГЕНА ПРИ СОЗДАНИИ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО КАТАРАЛЬНОГО РИНИТА У КРЫС

Тимченко М.Д.

Рассмотрены возможности моделирования катарального ринита у крыс с помощью интраназальных инстилляций различных флогогенов, использующихся в фармакологической практике, на фоне иммуносупрессии, индуцированной циклофосфаном. Проведена термометрия слизистой полости носа, морфологический анализ патологических изменений слизистой полости носа лабораторных животных и исследования лейкограммы периферической крови при использовании для индукции локального воспаления интраназальных инстилляций декстрана, каррагинана и серотонина в различных концентрациях. Оптимальным флогогеном для индукции воспаления слизистой оболочки носа у крыс является 0,1 %-ный раствор декстрана.

Ключевые слова: катаральный ринит, моделирование, флогогены.

CHOOSING THE BEST FLOGOHENU WHEN CREATING A MODEL OF CHRONIC CATARRHAL RHINITIS IN RATS

Timchenko M.D.

The possibilities of modeling catarrhal rhinitis in rats by intranasal instillation of various flogogens used in pharmaceutical practice, against the background of immunosuppression induced by cyclophosphamide. Thermometry performed nasal mucosa, morphological analysis of pathological changes in nasal mucosa in laboratory animals and studies leykogrammy peripheral blood when used for induction of local inflammation intranasal instillation of dextran, carrageenan and serotonin in different concentrations. Optimal for the induction of inflammation flogogen nasal mucosa of rats is 0.1% solution of dextran.

Key words: catarrhal rhinitis, modeling, flogogeny.