

УДК 612.017.1

Модель нейтрофильной бронхиальной астмы у мышей как инструмент для тестирования персонализированных лекарственных средств

© 2020 А.А. НИКОЛЬСКИЙ^{1*}, И.П. ШИЛОВСКИЙ¹, В.И. КОВЧИНА¹, Л.И. ВИШНЯКОВА¹, Е.Д. БАРВИНСКАЯ¹, С.И. БОЛОТОВА¹, К.В. ЮМАШЕВ¹, М.Р. ХАЙТОВ¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» Федерального медико-биологического агентства, Москва, 115522

*e-mail: aa.nikolskii@nrcii.ru

Поступила в редакцию 18.03.2020 г.

После доработки 10.04.2020 г.

Принята к публикации 22.07.2020 г.

Бронхиальная астма — это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, характеризующееся обратимой бронхиальной обструкцией и гиперреактивностью бронхов. Нейтрофильный эндотип бронхиальной астмы ассоциируется с агрессивным течением заболевания, выраженной деструкцией тканей и характеризуется низким ответом на стандартную терапию кортикостероидами. Все вышесказанное свидетельствует о необходимости создания новых лекарственных препаратов для терапии нейтрофильной астмы, для чего нужны адекватные модели этого заболевания на животных. Нами предложен протокол индукции экспериментальной нейтрофильной бронхиальной астмы у мышей, который включает внутрибрюшинную иммунизацию смесью модельного аллергена овальбумина и адьюванта Фрейнда с последующей аэрозольной провокацией тем же самым аллергеном в смеси с липополисахаридом. Данный подход позволил воспроизвести основные проявления нейтрофильной бронхиальной астмы: продукцию аллергенспецифических антител класса IgE, развитие гиперреактивности бронхов, ремоделирование респираторного тракта и инфильтрацию ткани легких нейтрофилами.

Ключевые слова: бронхиальная астма, мышинная модель, нейтрофилы

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-80-86

Бронхиальная астма (БА) — гетерогенное заболевание, которое обычно характеризуется хроническим воспалением дыхательных путей [1]. Длительное время считалось, что БА развивается исключительно по Th2-зависимому механизму, сопряженному с эозинофильным воспалением дыхательных путей. Однако к настоящему времени БА рассматривается как гетерогенное заболевание, включающее в себя несколько субгрупп патологии [2]. Накоплены экспериментальные свидетельства участия других воспалительных клеток — нейтрофилов — в патогенезе БА. Сообщалось, что количество нейтрофилов в мокроте коррелирует с тяжестью заболевания [3].

Большинство пациентов, страдающих от эозинофильной БА легкой и средней тяжести,

поддаются лечению с применением кортикостероидов. Однако, в отличие от эозинофильной, нейтрофильная астма трудно поддается традиционному лечению кортикостероидами [3, 4], в связи с чем необходимы альтернативные терапевтические подходы. По эпидемиологическим данным до 10% пациентов с БА проявляют резистентность к терапии кортикостероидами [5, 6], поэтому актуальна задача создания новых персонализированных лекарственных препаратов для лечения этой патологии. На сегодняшний день в мировой научной литературе описано множество моделей БА [7–9], но в подавляющем большинстве работ используют модели проявления астмы с эозинофильным типом воспаления легких.

Список сокращений: БА — бронхиальная астма; БАЛ — бронхоальвеолярный лаваж; ГРБ — гиперреактивность бронхов; ИФА — иммуноферментный анализ; LPS — липополисахарид; OVA — овальбумин.



Рис. 1. Дизайн исследования. На рисунке представлен протокол иммунизации мышей. Сокращения: OVA — овалбумин, ПАФ — полный адъювант Фрейнда, НАФ — неполный адъювант Фрейнда, LPS — липополисахарид, ГРБ — гиперреактивность бронхов, БАЛ — бронхоальвеолярный лаваж.

Fig. 1. Study design. The protocol of mice immunization is present. Abbreviations: OVA — ovalbumin, CFA — complete Freund's adjuvant, IFA — incomplete Freund's adjuvant, LPS — lipopolysaccharide, BHR — bronchial hyperreactivity, BAL — bronchoalveolar lavage.

На основании вышесказанного, целью проведенного исследования было создание модели нейтрофильной бронхиальной астмы у мышей.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Мышей-самок линии BALB/c возрастом 6–8 недель и весом 18–20 г приобретали в питомнике лабораторных животных Филиала ИБХ РАН в г. Пущино (Россия). Животных кормили стандартным лабораторным кормом для грызунов («БиоПро», Россия). Мышам был предоставлен неограниченный доступ к воде. Эксперименты на животных проводили в соответствии с принципами Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/EU от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, и были одобрены Этическим комитетом ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Мыши были разделены на две группы (по 8 мышей в каждой). Животных первой группы (нБА-3д) в первый день внутрибрюшинно сенсibilizировали 0,5 мл смеси 20 мкг овалбумина (OVA), эмульгированного в 100 мкл полного адъюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich, США). В дни 14 и 28 вводили внутрибрюшинно 20 мкг OVA, эмульгированного в 100 мкл неполного

адъюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich). Вторая группа лабораторных мышей (нБА-5д) была сенсibilizирована по протоколу, аналогичному группе нБА-3д. На 45–47 сутки животным первой экспериментальной группы вводили раствор 1 мг/мл OVA в смеси с 1 мг/мл липополисахарида (LPS) *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) в виде аэрозоля в течение 20 мин, а с животными группы нБА-5д проводили аналогичные манипуляции, но на 45–49 сутки. Мышей третьей группы (Норма) никаким манипуляциям не подвергали. После провокации у мышей оценивали гиперреактивность бронхов (ГРБ) и собирали кровь для определения уровней аллергенспецифических антител. На следующий день мышей умерщвляли цервикальной дислокацией и отбирали образцы бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) для определения клеточного состава; левое легкое фиксировали в 10%-ном формалине (Carl Roth, Германия) для изготовления гистологических срезов и оценки выраженности признаков воспаления (рис. 1).

После последней аэрозольной провокации аллергеном из ретроорбитального синуса мышей собирали периферическую кровь. Индивидуальные образцы сывороток получали путем центрифугирования при 350 g в течение 15 мин при комнатной температуре и хранили при — 70 °С до анализа. Уровни OVA-специфических

антител IgE, IgG1 и IgG2a в сыворотке анализировали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов (Becton Dickinson, США).

Измеряли ГРБ с помощью прибора для общей плетизмографии FinePointe NAM (Вухсо, США), оценивая удельное сопротивление дыхательных путей (sRaw) в ответ на ингаляционное введение возрастающих концентраций метахолина (Sigma-Aldrich): 6,25, 12,5 и 25 мг/мл.

Взятие образцов БАЛ проводили, сепарируя трахею и вводя в нее шприцем 0,5 мл полной среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 25 мМ НЕРЕС («ПанЭко»), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция), 300 мг/л L-глутамин («ПанЭко») и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США), затем отбирая введенную в легкие жидкость. В полученных образцах проводили подсчет общего количества клеток в камере Горяева. Далее образцы БАЛ центрифугировали в течение 7 мин при 2 000 об/мин при 4 °С. Часть осадка клеток наносили на предметное стекло, высушивали в течение 1 ч, фиксировали метанолом («Химмед», Россия) в течение 15 мин, после чего высушивали в течение 12 ч и окрашивали азуран-эозином («Гемстандарт», Россия). Клеточный состав мазка БАЛ определяли с помощью световой микроскопии, проводя подсчет не менее 300 клеток на один мазок при увеличении в 400 раз.

Для приготовления микропрепаратов легкие после длительной фиксации в формалине обезжировали путем проводки по спиртам, а потом заливали образцы в парафин. Микротомированием парафиновых блоков получали срезы легких толщиной 4–6 мкм. Полученные препараты окрашивали гематоксилин-эозином (Bio-Optica, Италия) для идентификации эозинофилов, нейтрофилов и лимфоцитов. Гистологическое исследование микропрепаратов легких осуществляли на световом микроскопе. Проводили полуколичественную оценку воспалительных изменений и ремоделирования бронхов по методике, описанной ранее [10]. Выраженность признаков воспаления оценивали в баллах, где: «0» — отсутствует, «1» — слабая, «2» — умеренная, «3» — сильная.

Для всех количественных данных вычисляли среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Межгрупповые различия определяли с помощью непараметрического *U*-критерия Манна-Уитни. Для полуколичественных данных вычисляли медиану и межквартильный размах. Межгрупповые различия определяли с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса. Статистический анализ

выполняли с применением программного обеспечения Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На следующий день после последней провокации у мышей брали кровь для последующей количественной оценки уровней аллергенспецифических антител. В образцах сывороток крови мышей двух экспериментальных групп детектировали антитела класса IgE и субклассов IgG1, IgG2a. Полученные данные свидетельствуют о том, что при иммунизации мышей произошла сенсibilизация их организма к аллергену — овалбумину, — а при дальнейшей провокации началась активная выработка иммунной системой аллергенспецифических антител.

Показатель ГРБ — важнейшая характеристика течения БА, поэтому через сутки после последней провокации аллергеном оценивали ГРБ мышей в ответ на ингаляционные введения возрастающих концентраций бронхоконстриктора метахолина. Во всех экспериментальных группах животных происходил статистически значимый прирост ГРБ — на 20% в сравнении с группой «Норма» (рис. 2). Такое повышение ГРБ у мышей, иммунизированных OVA в смеси с адьювантом Фрейнда и LPS, скорее всего, связано с тем, что протокол иммунизации индуцирует выработку высоких уровней специфических антител класса IgE — ключевых медиаторов развития симптомов астмы.

Через 2 сут после последней провокации у мышей был изучен клеточный состав БАЛ. Статистически значимый рост количества клеток в БАЛ происходил во всех двух экспериментальных группах (нБА-3д и нБА-5д) в сравнении с группой «Норма». Однако наибольший рост зарегистрирован у мышей с 5-дневной сенсibilизацией. В этой группе общее число всех клеток БАЛ достигало $318\,000 \pm 85\,000$ кл/мл, что на 15% больше, чем у мышей с трехдневной сенсibilизацией (группа нБА-3д), и в 16 раз больше, чем в группе «Норма».

Мы также обнаружили выраженную инфильтрацию легких нейтрофилами в группах, где провокация проходила 3 и 5 сут ($108\,000 \pm 53\,000$ и $193\,000 \pm 66\,000$ кл/мл соответственно), что составляло 40% и 60% от общего числа клеток в БАЛ. Полученные данные свидетельствуют о более существенной инфильтрации нейтрофилами легких мышей, получивших 5 ингаляций смесью OVA и LPS, по сравнению с животными, которым проведено 3 ингаляции (в этой группе нейтрофилы составляли менее 0,3% от общего числа клеток БАЛ) (рис. 3).

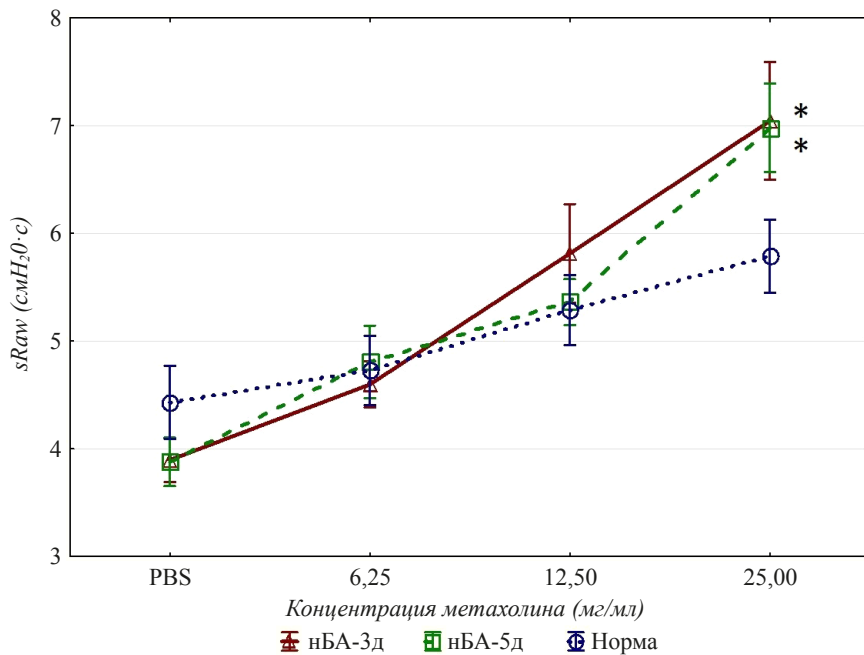


Рис. 2. Гиперреактивность бронхов в ответ на аэрозольное введение возрастающих концентраций метахолина. Гиперреактивность бронхов оценивали по показателю удельного сопротивления дыхательных путей (sRaw); представлены средние значения см(H₂O)×с ± стандартная ошибка, n=8. *Статистически значимое отличие от группы «Норма» по U-критерию Манна–Уитни. Отличия принимались значимыми при $p \leq 0,05$.

Fig. 2. Hyperresponsiveness of the bronchi in response to aerosol administration of methacholine in increasing concentrations. Hyperresponsiveness of the bronchi was evaluated by the indicator of specific resistance of the airways (sRaw); mean values of cm(H₂O)×s ± standard error are presented, n = 8. *Statistically significant difference from the Norma group according to the Mann–Whitney U-test. Differences were considered significant at $p \leq 0,05$.

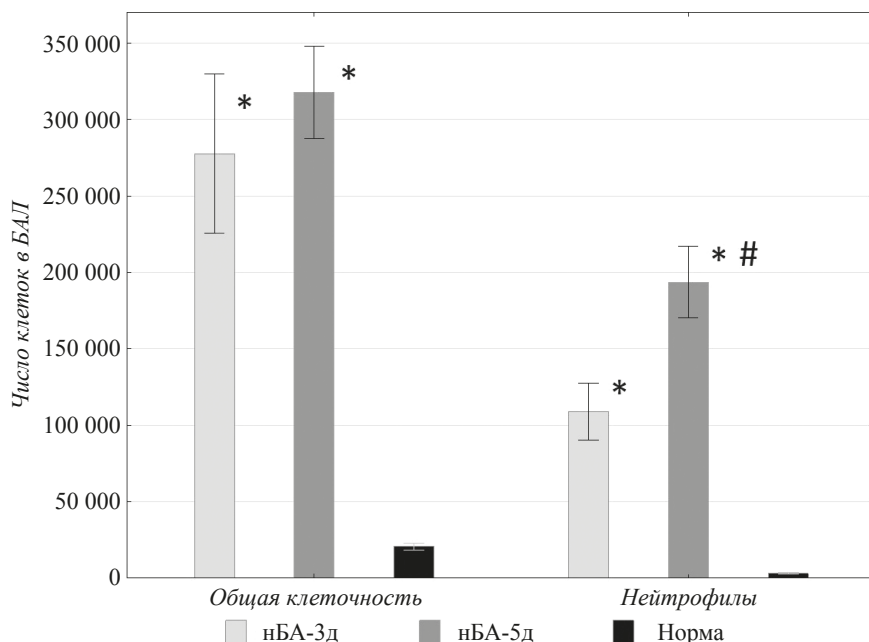


Рис. 3. Клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа. Представлены средние значения числа клеток в 1 мл БАЛ ± стандартная ошибка, n = 8. *Статистически значимо отличается от группы «Норма»; # — статистически значимо отличается от группы «нБА-3д» по U-критерию Манна–Уитни. Отличия принимались значимыми при $p \leq 0,05$.

Fig. 3. Cellular composition of bronchoalveolar lavage. Presents the average number of cells in 1 ml of BAL ± standard error, n = 8. *Statistically significant difference from the Norma group; # — statistically significant difference from the nBA-3d group according to the Mann–Whitney U-test. Differences were considered significant at $p \leq 0,05$.

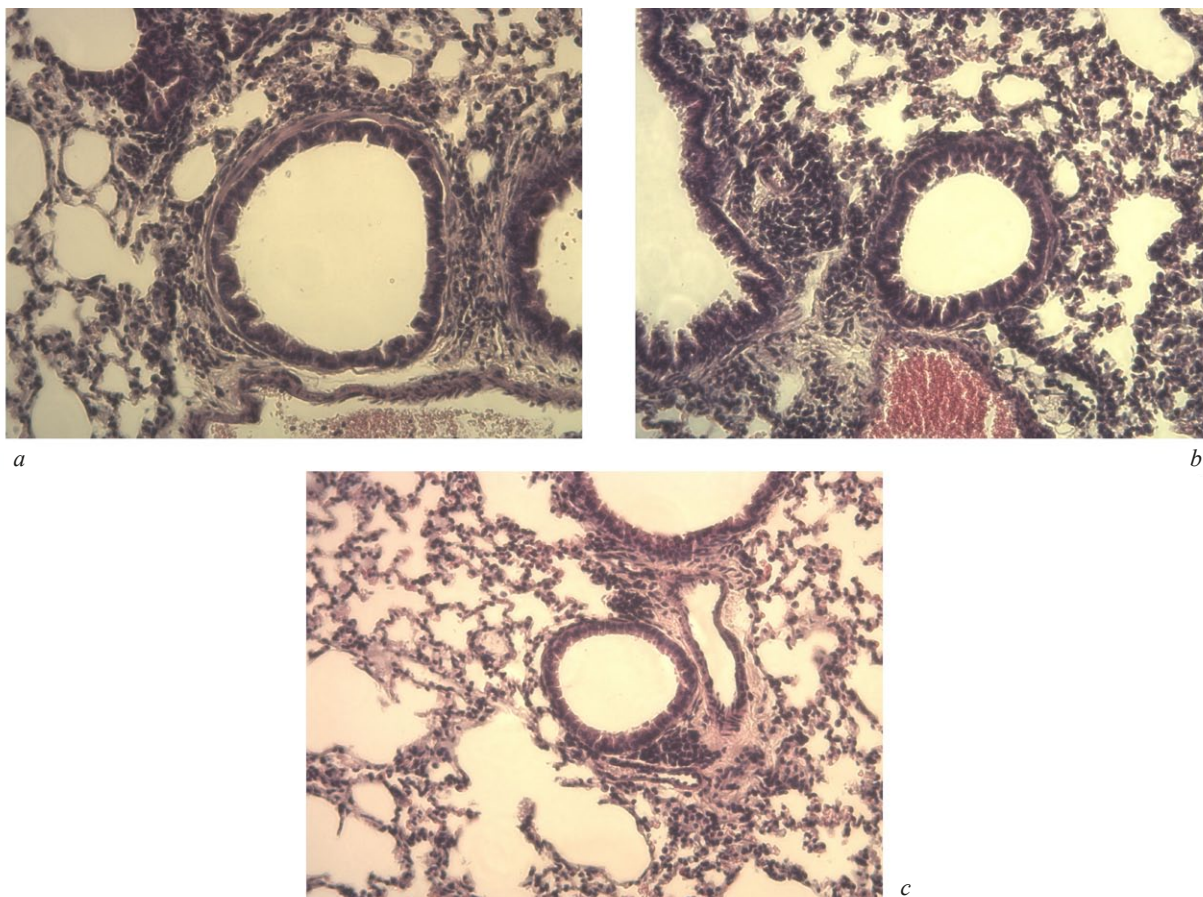


Рис. 4. Гистология легочной ткани при 200-кратном увеличении: группа нБА-3д (а), группа нБА-5д (б), группа «Норма» (с).

Fig. 4. Histology of lung tissue at the 200× magnification: nBA-3d group (a), nBA-5d group (b), Norma group (c).

При анализе БАЛ были также подсчитаны и другие типы клеток: лимфоциты, моноциты и эозинофилы. Вся картина в процентном содержании от общего числа клеток, если сравнивать группы нБА-3д и нБА-5д, выглядит так: лимфоциты 38% и 20%, моноциты 9% и 8%, эозинофилы 12% и 10% соответственно.

Гистологический анализ выявил значительное воспаление в ткани легких у мышей двух экспериментальных групп (нБА-3д и нБА-5д) в сравнении с группой «Норма». Гистологическое исследование в целом подтвердило данные, полученные при анализе клеточного состава БАЛ. В частности, незначительная инфильтрация дыхательных путей эозинофилами ожидаемо наблюдалась у мышей из-за иммунизации аллергеном в смеси с адьювантом. Была оценена не только степень перибронхиальной инфильтрации воспалительными клетками, но и выраженность признаков ремоделирования дыхательных путей, таких как гипертрофия гладких мышц, метаплазия и гиперплазия бронхиальных клеток эпителия. Гипертрофия гладких мышц не наблюдалась ни в одной из экспериментальных групп.

Метаплазия и гиперплазия бокаловидных клеток бронхиального эпителия наблюдались в обеих экспериментальных группах (нБА-3д и нБА-5д), но не в группе «Норма» (рис. 4 и 5). Полуколичественная оценка воспалительных изменений и ремоделирования бронхов, где выраженность признаков воспаления оценивали в баллах («0» — отсутствует, «1» — слабая, «2» — умеренная, «3» — сильная), выявила общую картину слабого воспаления только в группе нБА-5д. В остальных группах, если придерживаться этой системы оценки, воспаление отсутствовало.

Стоит отметить, что в опубликованном ранее исследовании [11] мы использовали похожую модель БА, которую теперь модифицировали: увеличили длительность воздействия (число сут и соответственно ингаляций) и изменили концентрации используемых веществ. Например, концентрация OVA снижена с 10 до 1 мг/мл, а концентрация LPS повышена с 0,1 до 1 мг/мл. Все эти манипуляции привели к тому, что иммунная система мышей начала привлекать в очаг воспаления (легкие) большее количество нужных нам клеток — нейтрофилов (60% по сравнению с 20%

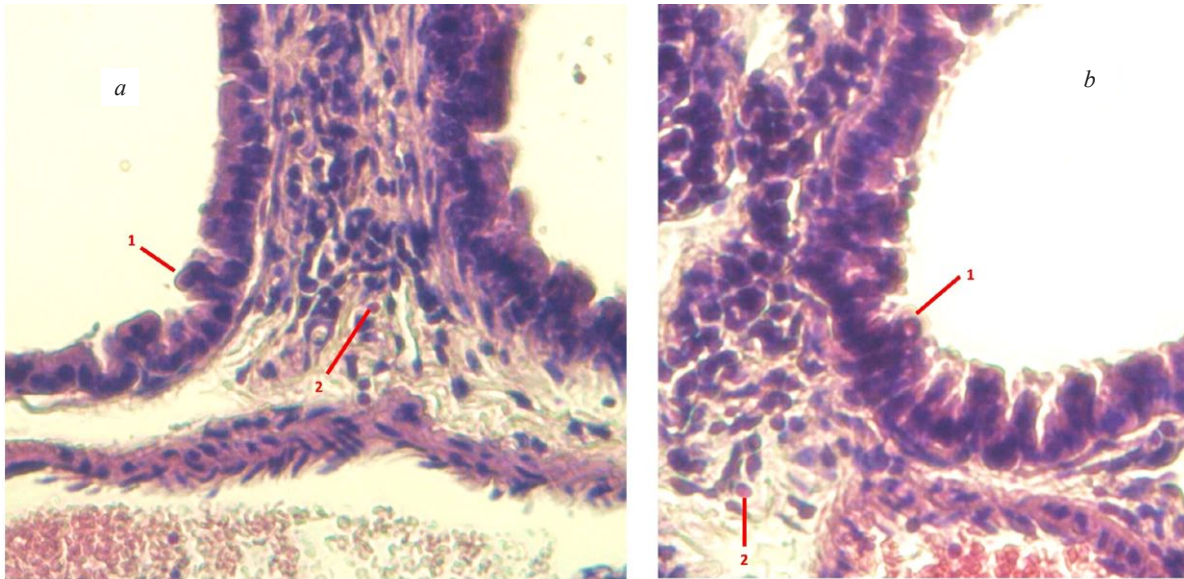


Рис. 5. Гистология легочной ткани при 400-кратном увеличении: группа нБА-3д (а), группа нБА-5д (б). Стрелками указаны бокаловидные клетки (1) и эозинофилы (2).

Fig. 5. Histology of lung tissue at the 400× magnification: nBA-3d group (a), nBA-5d group (b). Arrows indicate goblet cells (1) and eosinophils (2).

в исследовании [11]), что необходимо для адекватной модели патологии БА.

Таким образом, нами предложен протокол индукции экспериментальной нейтрофильной бронхиальной астмы у мышей, который включает внутрибрюшинную иммунизацию смесью модельного аллергена OVA и адьюванта Фрейнда с последующей аэрозольной провокацией тем же самым аллергеном в смеси с LPS. Разработанный подход позволил воспроизвести основные проявления нейтрофильной БА: продукцию аллергенспецифических антител класса IgE, развитие гиперреактивности бронхов, ремоделирование респираторного тракта и инфильтрацию ткани легких нейтрофилами. Созданная модель может быть использована для тестирования новых персонализированных лекарственных средств, предназначенных для терапии нейтрофильной бронхиальной астмы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (№ МД-1578.2019.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bateman E.D., Hurd S.S., Barnes P.J., et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur. Respir. J.*, 2018, 51(2), 143–178. doi: 10.1183/13993003.51387-2007

2. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.*, 2012, 18(5), 716–725. doi: 10.1038/nm.2678
3. Moore W.C., Hastie A.T., Li X., et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, 133(6), 1557–1563. doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.011
4. Chambers E.S., Nanzer A.M., Pfeffer P.E., et al. Distinct endotypes of steroid-resistant asthma characterized by IL-17A high and IFN- γ high immunophenotypes: potential benefits of calcitriol. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, 136(3), 628–637. doi: 10.1016/j.jaci.2015.01.026
5. Dockrell M., Partridge M.R., Valovirta E. The limitations of severe asthma: the results of a European survey. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, 62(2), 134–141. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01304.x
6. Holgate S.T., Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet*, 2006, 368(9537), 780–793. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69288-X
7. Shin Y.S., Takeda K., Gelfand E.W. Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2009, 1(1), 10–18. doi: 10.4168/aa.2009.1.1.10
8. Aun M.V., Bonamichi-Santos R., Arantes-Costa F.M., Kalil J., Giavina-Bianchi P. Animal models of asthma: utility and limitations. *J. Asthma Allergy*, 2017, 10, 293–301. doi: 10.2147/JAA.S121092
9. Mullane K., Williams M. Animal models of asthma: reprise or reboot? *Biochem. Pharmacol.*, 2014, 87(1), 131–139. doi: 10.1016/j.bcp.2013.06.026

10. Ennis D.P., Cassidy J.P., Mahon B.P. Acellular pertussis vaccine protects against exacerbation of allergic asthma due to *Bordetella pertussis* in a murine model. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005, 12(3), 409–417. doi: 10.1128/CDLI.12.3.409-417.2005
11. Шиловский И.П., Никольский А.А., Ковчина В.И., Болотова С.И., Вишнякова Л.И., Соколова А.Р., Барвинская Е.Д., Хаитов М.Р. Активация Th17-иммунного ответа при экспериментальной нейтрофильной бронхиальной астме у мышей. *Иммунология*, 2019, 40(6), 5–15. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16001

A Model of Neutrophilic Bronchial Asthma in Mice as a Tool for Testing Personalized Drugs

A.A. NIKOLSKII¹*, I.P. SHILOVSKIY¹, V.I. KOVCHINA¹, L.I. VISHNIAKOVA¹, E.D. BARVINSKAYA¹, S.I. BOLOTOVA¹, K.V. YUMASHEV¹, and M.R. KHAITOV¹

¹ National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, 115522 Russia

*e-mail: aa.nikolskii@nrcii.ru

Received March 18, 2020

Revised April 10, 2020

Accepted July 22, 2020

Abstract—Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease of the respiratory tract characterized by reversible bronchial obstruction and bronchial hyperreactivity. The neutrophilic endotype of bronchial asthma is associated with an aggressive course of the disease, severe tissue destruction and a low response to standard corticosteroid therapy. All of the above indicates the need to create new drugs for the treatment of neutrophilic asthma, which requires adequate animal models of this disease. We have proposed a protocol for the induction of experimental neutrophilic bronchial asthma in mice, which includes intraperitoneal immunization with a mixture of a model allergen of ovalbumin and Freund's adjuvant followed by aerosol challenge with the same allergen mixed with the lipopolysaccharide. This approach made it possible to reproduce the main manifestations of neutrophilic bronchial asthma: the production of IgE allergen-specific antibodies, the development of bronchial hyperreactivity, respiratory tract remodeling and the lung tissue infiltration with neutrophils.

Key words: bronchial asthma, murine model, neutrophils

Fundings—The work was supported by the Grant of the President of the Russian Federation (no. MD-1578.2019.4).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-80-86