

Санкт-Петербургская государственная
химико-фармацевтическая академия
Кафедра фармакологии и клинической фармакологии

Модификация экспериментальной модели бронхиальной астмы и исследование биодоступности ингаляционных β -адреноблокаторов

Рябинина Е.С. - студ. 5 курса ФФ
Руководитель: д.м.н. проф. Оковитый С.В.

Санкт-Петербург
2013

Актуальность проблемы (1)

- ▣ По данным, приведенным в рекомендациях GINA на 2011 год, количество пациентов, страдающих бронхиальной астмой (БА), составляло 300 миллионов человек;
- ▣ По оценкам от БА умирают 250000 человек в год, при этом показатели смертности слабо коррелируют с распространенностью заболевания (GINA, 2011);
- ▣ Все более актуальной становится проблема создания адекватной и воспроизводимой модели бронхиальной астмы на животных, в частности на крысах.



Актуальность проблемы (2)

- ▣ В настоящее время применение β -адреноблокаторов у пациентов с бронхиальной астмой ограничено;
- ▣ Ряд исследований свидетельствуют, что введение β -адреноблокаторов может снижать выраженность воспаления в дыхательных путях при экспериментальной бронхиальной астме [Nguen L.P., 2008; Ворончихин П.А., 2012];
- ▣ Однако вопросы ингаляционной биодоступности этих препаратов остаются не исследованными.



Цели работы :

1) Модификация овальбуминовой модели бронхиальной астмы на аутбредных крысах;

2) оценка риска системного действия β -адреноблокаторов при ингаляционном введении.



Задачи:

- 1) Оценить возможность воспроизведения модели бронхиальной астмы на аутбредных крысах;
- 2) Апробировать возможность замены адъюванта при моделировании бронхиальной астмы;
- 3) Оценить проникновение β -адреноблокаторов в системный кровоток при их ингаляционном введении экспериментальным животным.

Патогенез бронхиальной астмы

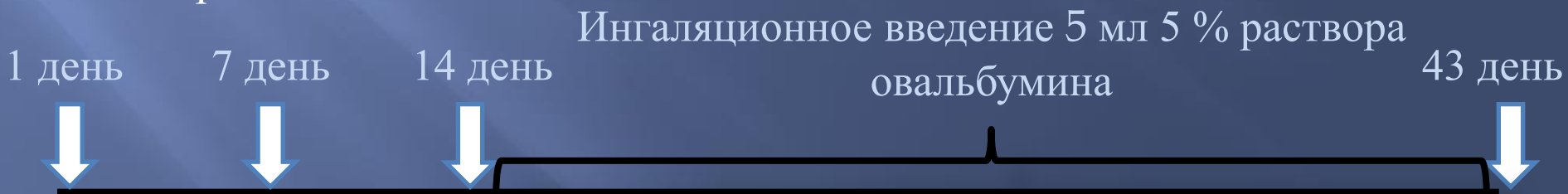


Моделирование бронхиальной астмаы

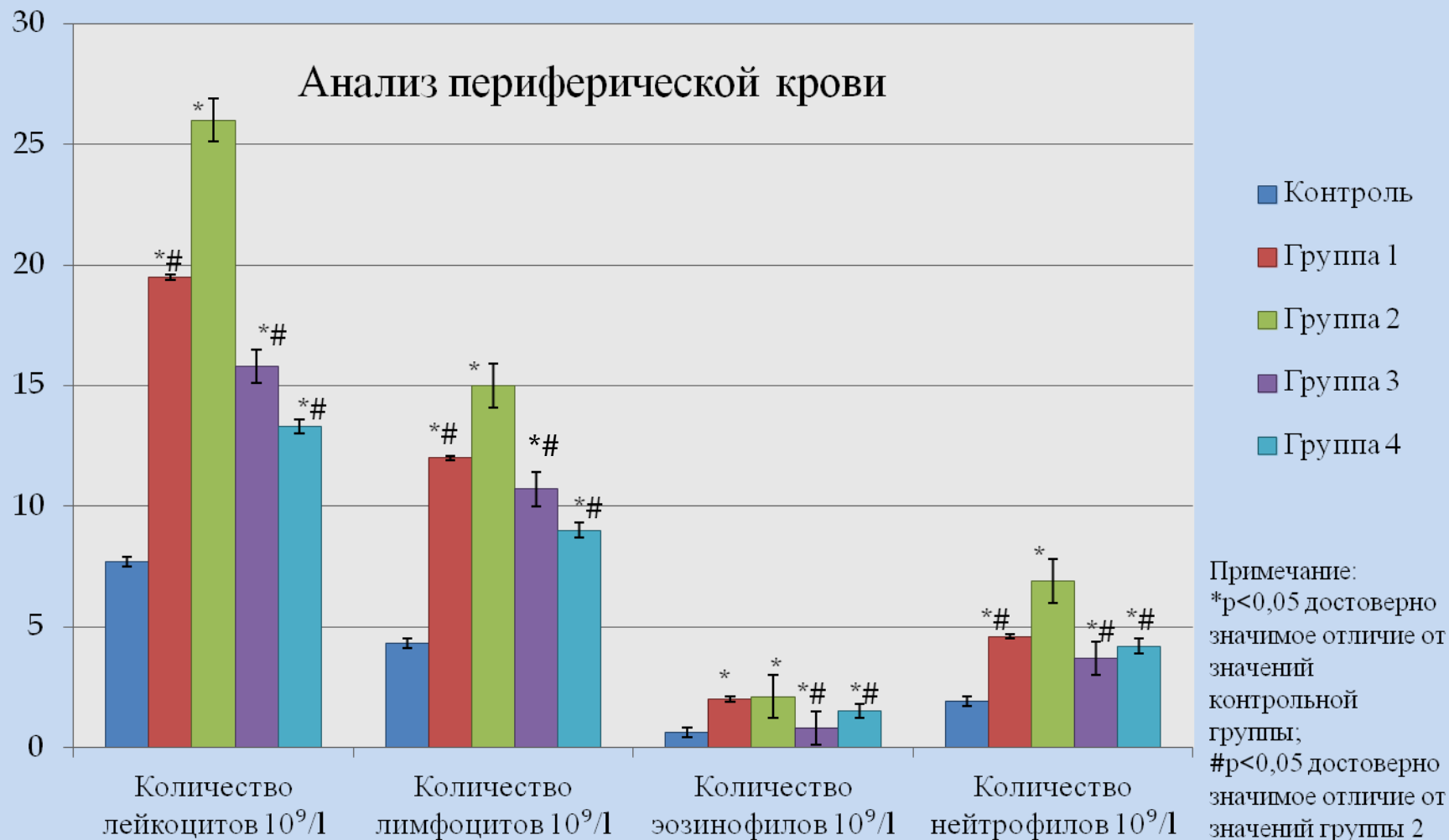
- Овальбумин широко используется для иммунизации при моделировании аллергических заболеваний, в том числе экспериментальной бронхиальной астмаы [M. Wegmann, 2007];
- Аллерген с адьювантом вызывает хроническое воспаление в дыхательных путях (ДП) с их последующей инфильтрацией эозинофилами. При длительном введении аллергена происходят структурные изменения в ДП [Kamachi A., 2001];
- В ряде работ в качестве адьюванта предлагается использование убитой культуры *Bordetella pertussis* [Kamachi A., 2001];
- Нами была предложена модификация классической овальбуминовой модели бронхиальной астмаы с использованием в качестве адьюванта препарата «Бронхо-мунал», содержащего стандартизированный лиофилизированный лизат бактерий *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* и др.

Воспроизведение модели бронхиальной астмы на аутбредных крысах

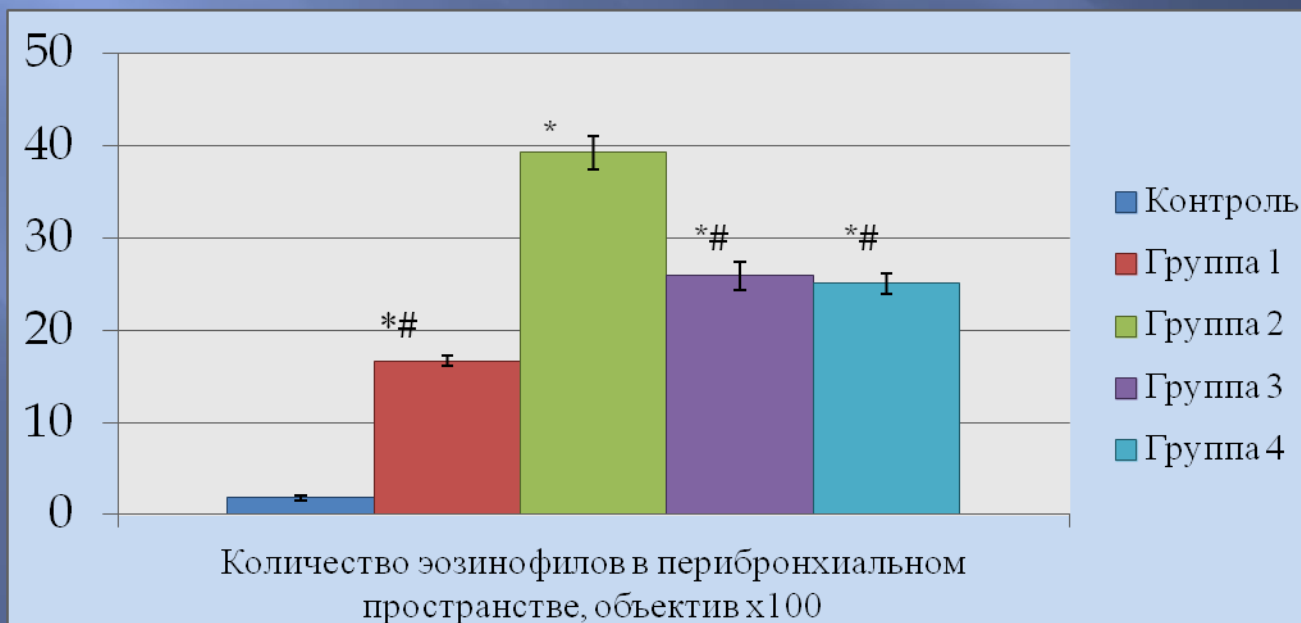
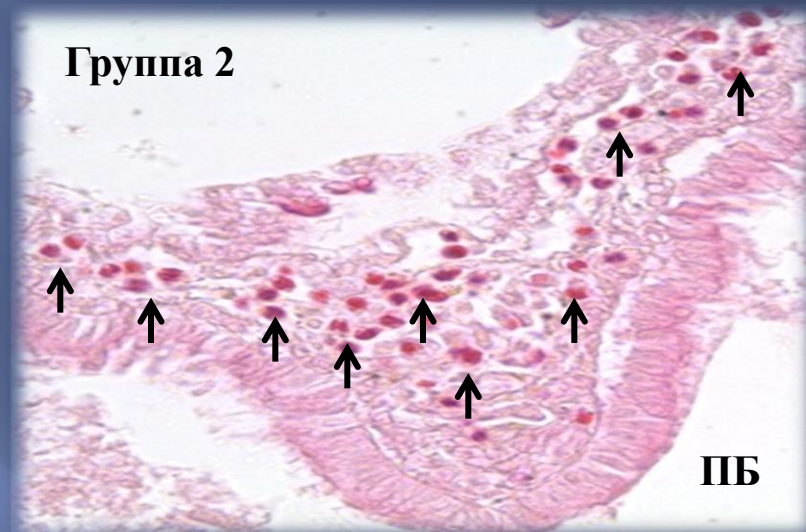
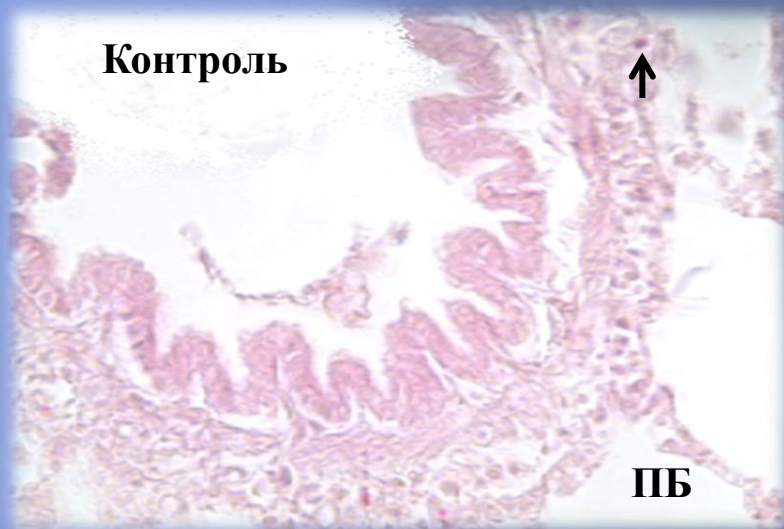
1. Были сформированы 4 опытных группы животных (n=5) и контрольная группа (n=5);
2. В 1 и 7 день животным опытных групп подкожно вводили овальбумин, адсорбированный на гелеобразном $Al(OH)_3$ в соотношении 1:100, в дозе 10 мг/кг по основному веществу;
3. Параллельно 1-4 группе вводили внутрибрюшинно 1 мл адъюванта, содержащего одну из доз (0,5; 2,5; 5; 10 мг/кг) препарата “Бронхо-мунал”, растворенного в физиологическом растворе;
4. Спустя неделю после последней инъекции и в каждые последующие 3 дня опытным группам ингаляционно вводилось по 5 мл 5% раствора овальбумина в течение 15 минут;
5. На 43-й день производили взятие материала с его последующей фиксацией и окраской.



Анализ периферической крови

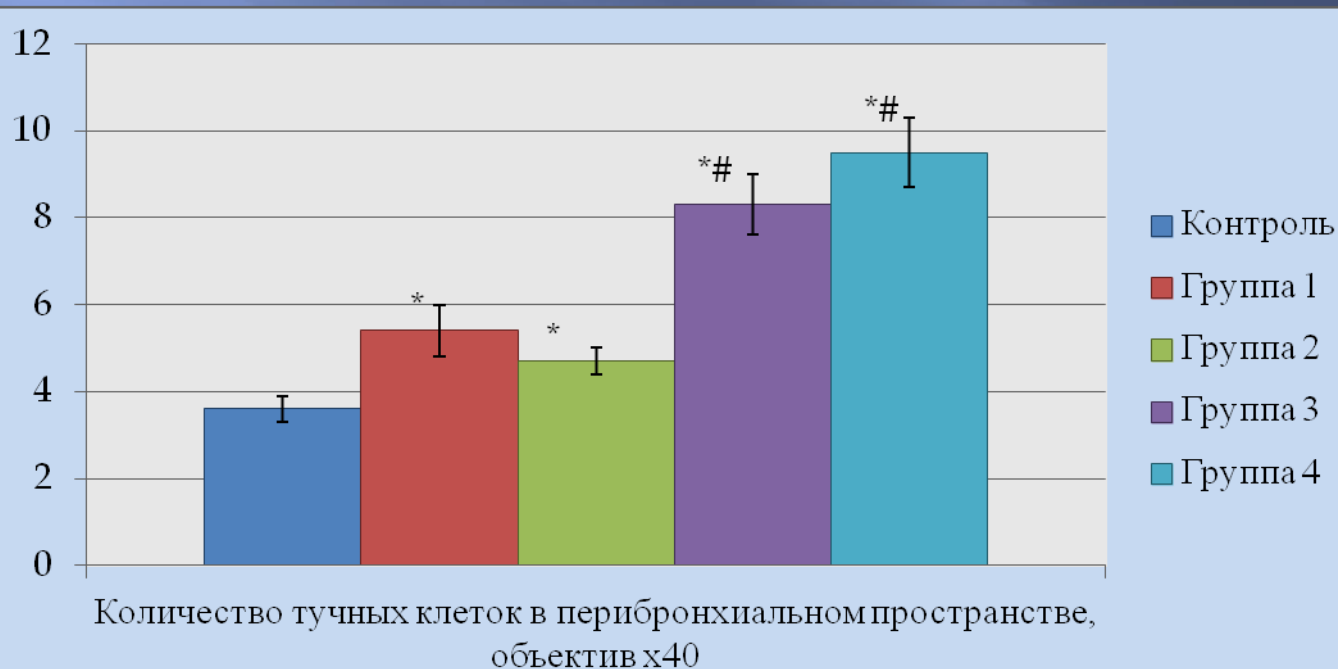
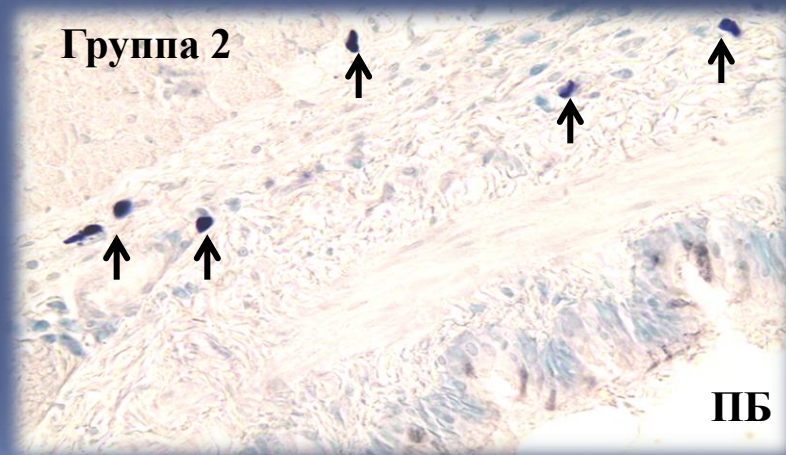
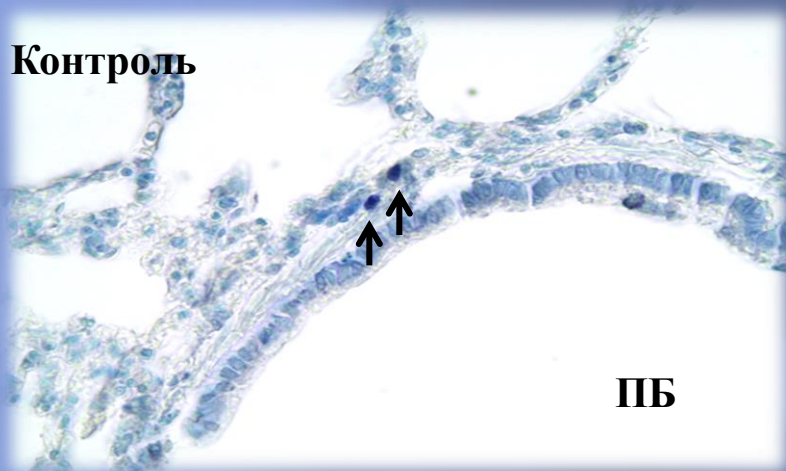


Количество эозинофилов в перибронхиальном пространстве, x100



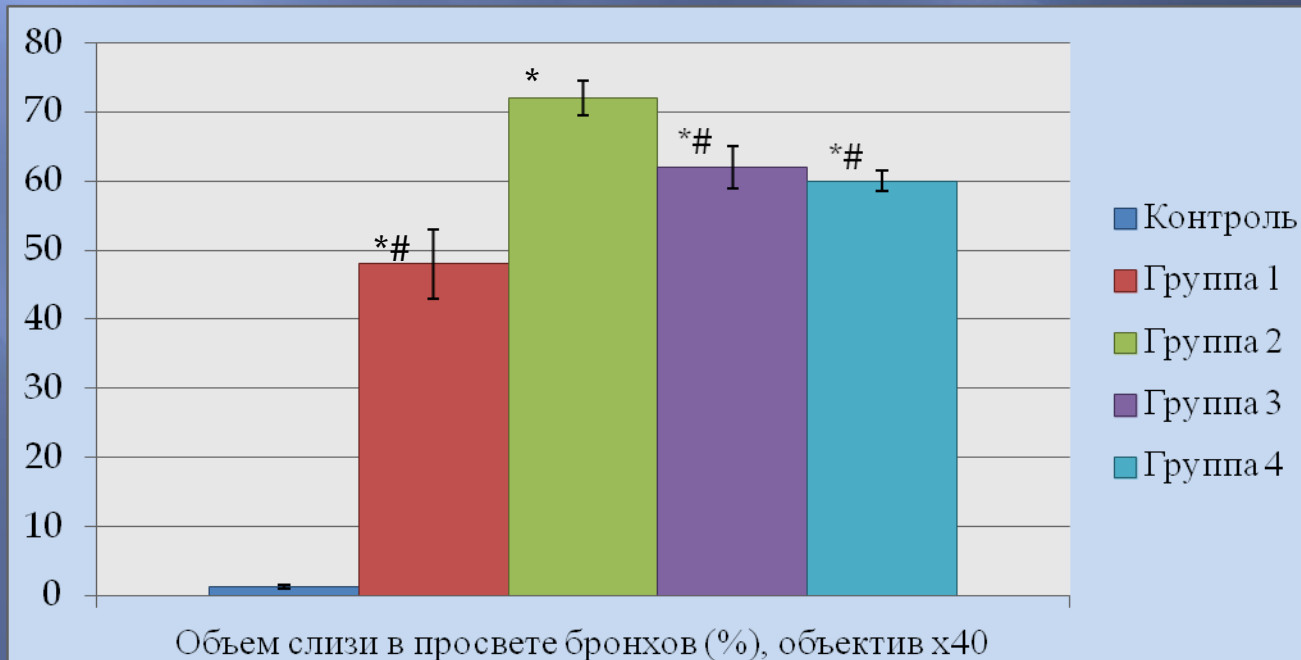
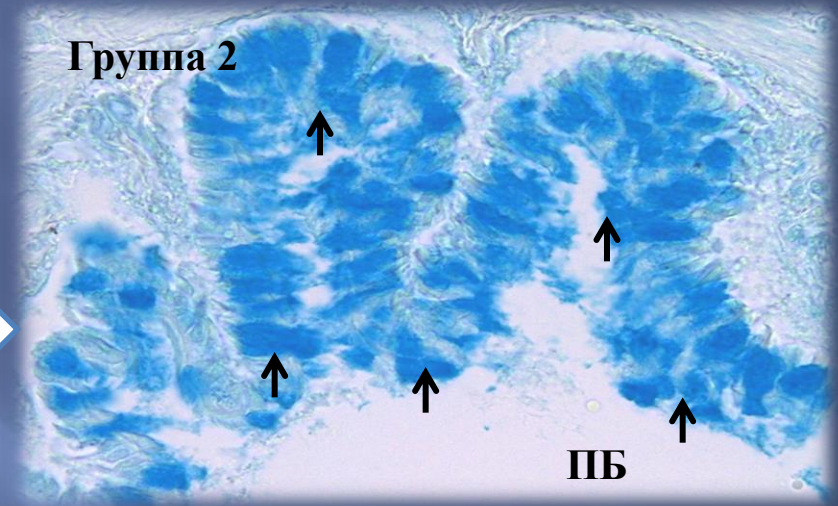
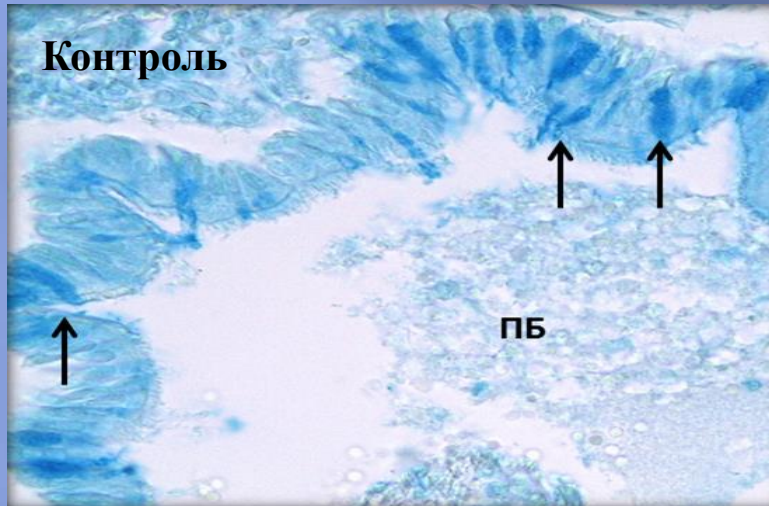
Примечание: * $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений контрольной группы; # $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений группы 2

Количество тучных клеток в перибронхиальном пространстве, x40



Примечание: * $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений контрольной группы; # $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений группы 2

Изменение секреции слизи в малых бронхах, x40

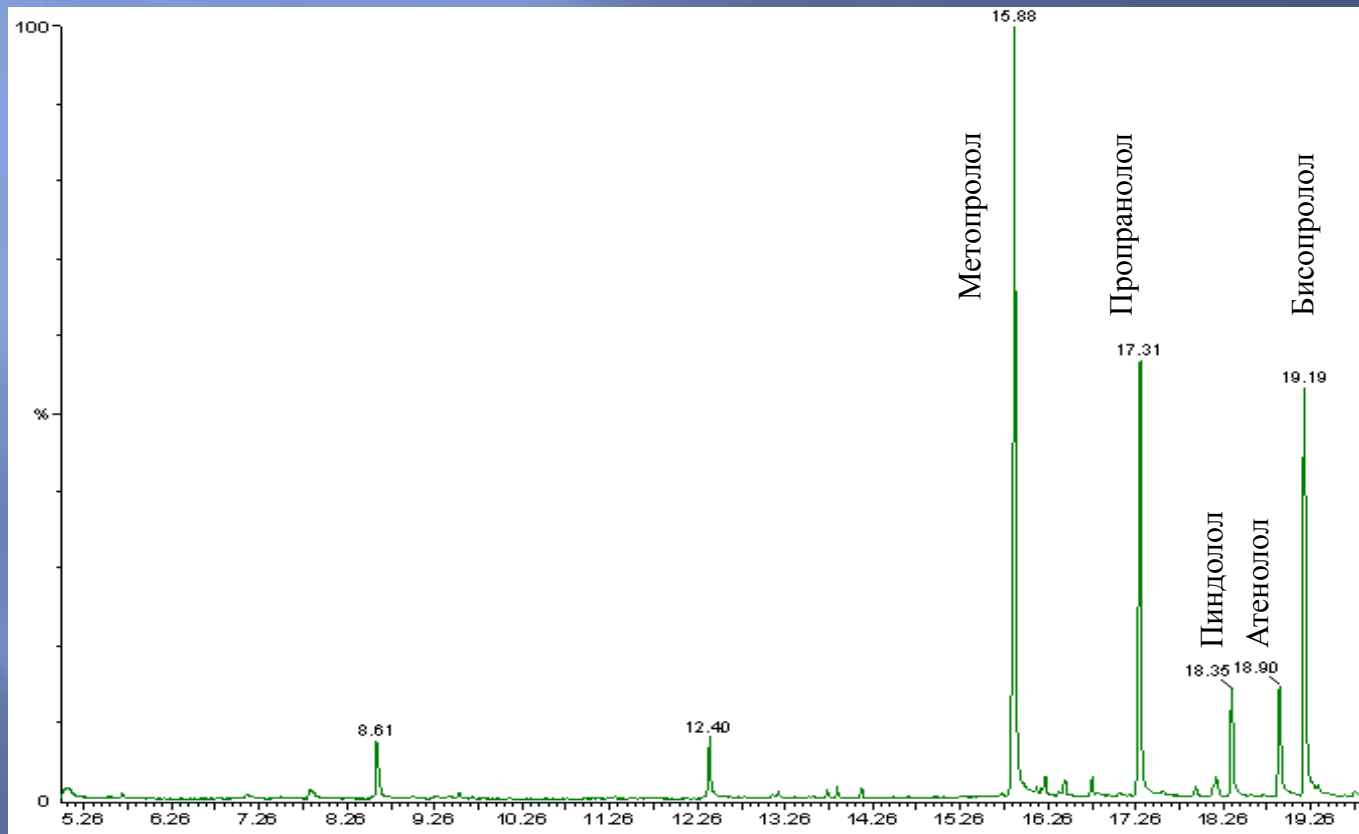


Примечание: * $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений контрольной группы; # $p < 0,05$ достоверно значимое отличие от значений группы 2

Оценка проникновения в системный кровоток β -адреноблокаторов при их ингаляционном введении (1)

- ▣ Был проведен модельный опыт по экстрагированию веществ из крови животных. У 6 крыс была отобрана кровь в пробирки с цитратом натрия;
- ▣ Далее к 2 мл цельной крови было добавлено по 30 мкл раствора пропранолола, метопролола, атенолола, бисопролола или пиндолола в ДМФА. Также была сделана контрольная проба – в пробирку с кровью добавляли 30 мкл ДМФА;
- ▣ Затем к подготовленным растворам веществ в крови и контрольной пробе добавляли по 10 мкл гидроксида натрия (0,2 М) и 6 мл ацетонитрила (по каплям). Смесь встряхивали механически с помощью лабораторного встряхивателя в течение 10 мин и затем центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин;
- ▣ Органический слой отбирали, фильтровали по мере необходимости и анализировали методом ГХ/МС в ЦККЛС СПХФА.

Оценка проникновения в системный кровоток β -адреноблокаторов при их ингаляционном введении (2)



В результате установлено, что при использовании данной методики происходит экстрагирование β -адреноблокаторов из цельной крови и она может быть использована для дальнейшего определения этих препаратов в крови экспериментальных животных.

Хроматограмма β -адреноблокаторов после извлечения из цельной крови

Оценка проникновения в системный кровоток β -адреноблокаторов при их ингаляционном введении (3)

- ▣ 5 животным вводились ингаляционно растворы β -адреноблокаторов - атенолола, метопролола, пропранолола, бисопролола или пиндолола в дозе 1 мг/3 мл при экспозиции 15 мин;
- ▣ Через 30 мин у всех животных отбирали по 2 мл крови в пробирки с цитратом натрия, также была сделана контрольная проба;
- ▣ Затем проводили экстракцию β -адреноблокаторов из крови. Для этого к полученной крови добавляли по 10 мкл гидроксида натрия (0,2 М) и по 6 мл ацетонитрила по каплям;
- ▣ Смесь встряхивали механически с помощью лабораторного встряхивателя в течение 10 мин и затем центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин;
- ▣ Органический слой отбирали, фильтровали по мере необходимости и анализировали методом ГХ/МС в ЦККЛС СПХФА;
- ▣ В результате было установлено, что искомые вещества не обнаруживаются в извлечении из крови экспериментальных животных после ингаляционного введения.

ВЫВОДЫ

- 1) Овальбуминовая модель бронхиальной астмы может быть успешно воспроизведена на аутбредных крысах;
- 2) Замена адьюванта при воспроизведении овальбуминовой модели бронхиальной астмы возможна с использованием в качестве адьюванта препарата “Бронхо-Мунал” в дозе 2,5 мг/кг, что подтверждается данными проведенного эксперимента;
- 3) Подобрана методика экстрагирования β -адреноблокаторов из крови;
- 4) После ингаляционного введения β -адреноблокаторов животным и анализа извлечения методом ГХ/МС установлено, что искомые вещества не обнаруживаются в извлечении из крови экспериментальных животных.

Практическая значимость

- ▣ Модификация овалбуминовой модели БА позволяет использовать новый вариант классической модели в дальнейших исследованиях, сделав ее более доступной благодаря выполнению на аутбредных животных и замене труднодоступного адьюванта (культуры *B. pertussis*) более доступным препаратом «Бронхо-Мунал».



Спасибо за внимание!

