

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ДЪЯКОВА ЕЛЕНА ЮРЬЕВНА

**СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЛАДКИХ МЫШЦ БРОНХОВ ПРИ
ФОРМИРОВАНИИ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ ВОЗДУХОНОСНЫХ
ПУТЕЙ**

03.00.13. – физиология

03.00.02. - биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор
КАПИЛЕВИЧ Л.В.

ТОМСК – 2004

Перечень принятых сокращений

NO – оксид азота

АТФ (АТР) – аденозин трифосфат

АЦ – аденилатциклаза

БА – бронхиальная астма

БАВ - биологически активные вещества

ВП – воздухоносные пути

ГМ – гладкие мышцы

ГМК – гладкомышечная клетка

ГТФ (GTP) – гуанозин трифосфат

ГЦ - гуанилатциклаза

ДАГ - диацилглицерол

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИЛ – интерлейкин

ИТФ - инозитолтрифосфат

КЛЦМ - киназа легких цепей миозина

КМ – кальмодулин

ЛТ – лейкотриен

МН – механическое напряжение

ПГ – простагландин

ПК –С – протеинкиназа С

ПК-G – цГМФ-активируемая протеинкиназа

ПК-A – цАМФ-активируемая протеинкиназа

СПР – саркоплазматический ретикулум

ФДЭ (PDE) – фосфодиэстераза

Ig – иммуноглобулин

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЛАДКИХ МЫШЦ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ.....	12
1.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ БРОНХОСПАСТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ	23
1.2.1. Способы моделирования бронхоспастических состояний у экспериментальных животных.....	24
1.2.2. Патоморфология легких при моделировании бронхоспастических состояний у животных	27
1.2.3. Иммунологическая характеристика экспериментальной бронхиальной астмы.....	29
1.2.4. Метаболические расстройства при моделировании бронхиальной астмы в эксперименте	32
1.2.5. Оценка бронхоконстрикторных и бронхолитических эффектов фармакопрепаратов на экспериментальных моделях.....	35
1.3. РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА 5 В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ.....	37
ГЛАВА II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.2. МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ	48
2.3. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ	53
ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	55
3.1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СТЕНКЕ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ БРОНХОВ	55
3.2. ОСОБЕННОСТИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ГЛАДКИХ МЫШЦ	

ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ В УСЛОВИЯХ ФОРМИРОВАНИЯ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ .	56
3.2.1. <i>Исследование особенностей гистаминергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях формирования гиперреактивности.....</i>	59
3.2.2. <i>Исследование особенностей адренергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях формирования гиперреактивности.....</i>	73
3.2.3. <i>Исследование особенностей холинэргической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях формирования гиперреактивности.....</i>	88
3.3. ВЛИЯНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА 5 НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГЛАДКИХ МЫШЦ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ МОРСКИХ СВИНОК В УСЛОВИЯХ ФОРМИРОВАНИЯ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ.....	92
3.4. ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА 5 НА СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГЛАДКИХ МЫШЦ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ МОРСКИХ СВИНОК В УСЛОВИЯХ ФОРМИРОВАНИЯ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ	99
3.5. КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ГЛАДКИХ МЫШЦ ВОЗДУХОНОСНЫХ ПУТЕЙ.....	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ.....	123
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования:

Изучение механизмов регуляции электрических и сократительных свойств гладких мышц (ГМ) внутренних органов, выяснение патогенеза заболеваний и разработка способов коррекции функциональных расстройств является актуальной проблемой современной физиологии и медицины [9, 31]. Особое значение названная проблема имеет для системы дыхания. Значительная часть заболеваний респираторной системы связана с нарушением регуляторных механизмов гладкомышечных клеток стенки воздухоносных путей [1, 81, 154].

Перспективным путем выяснения этих механизмов является моделирование дисфункции респираторного тракта у экспериментальных животных [27, 99, 169]. Экспериментальные модели используются для изучения различных аспектов патогенеза и апробации новых способов лечения. В модельных экспериментах изучались активность тканевых и сывороточных ферментов, гормональный и иммунный статус, морфологические изменения тканей [6, 63, 131]. Однако в доступной литературе мы не обнаружили исследований сократительных свойств гладких мышц бронхов в условиях формирования гиперреактивности воздухоносных путей у животных, хотя именно нарушение тонуса и реактивности бронхов является конечным патогенетическим звеном многих бронхолегочных заболеваний, в том числе бронхиальной астмы.

Ранее была продемонстрирована ассоциация полиморфизма С-703Т гена интерлейкина 5 с атопической бронхиальной астмой [43]. Роль интерлейкина 5 в процессе развития эозинофилии в дыхательных путях была подтверждена с использованием моноклональных антител к интерлейкину 5 [89, 90, 106]. Исследования на трансгенных животных (нокаут-мышьях по генам интерлейкина 5, растворимого рецептора интерлейкина 5 и животных с

гиперэкспрессией этих генов) также подтверждают гипотезу о том, что интерлейкин 5 является одним из ключевых цитокинов, участвующих в развитии атопического воспаления при бронхиальной астме [85, 106, 138]. Интерлейкин 5 принимает непосредственное участие в развитии основных проявлений астмы, так как его гиперпродукция связана с эозинофилией в дыхательных путях и повышенной секрецией эозинофилами биологически активных веществ, которые стимулируют сокращение гладкой мускулатуры бронхов, секрецию слизи, вызывают альтерацию эпителия дыхательных путей, дегрануляцию тучных клеток и базофилов. Результатом чего является повреждение окружающих тканей [80, 178].

Исследования с использованием моноклональных антител к интерлейкину 5 и рецептору интерлейкина 5 показали, что анти-интерлейкин 5 терапия, помимо редукции эозинофильного воспаления, может приводить к снижению гиперреактивности дыхательных путей при астме и улучшать функцию легких. Однако в исследованиях на морских свинках с экспериментальной бронхиальной астмой было отмечено, что для угнетения гиперреактивности дыхательных путей необходимы более высокие дозы препаратов моноклональных антител к интерлейкину 5, чем для блокирования эозинофильного воспаления [90, 106].

Данные Salvi S. et al и Nakonarson H. et al [101, 152] позволяют предположить, что интерлейкин 5 может непосредственно продуцироваться эпителиальными клетками воздухоносных путей и оказывать влияние на гладкие мышцы бронхов. Все это делает интерлейкин 5 перспективной терапевтической мишенью для селективного уменьшения тканевого воспаления, без иммуносупрессивных последствий, связанных с регулярным применением таких препаратов, как стероиды.

Все изложенное обуславливает актуальность и научную новизну настоящего исследования.

Цель работы:

Изучить сократительные свойства гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях сенсibilизации овальбумином и при воздействии интерлейкина 5.

Задачи:

1. Исследовать особенности гистаминергических, адренергических и холинергических сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок при сенсibilизации овальбумином.

2. Изучить влияние бронхиального эпителия на характер гистаминергических, адренергических и холинергических сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей у морских свинок при сенсibilизации овальбумином.

3. Исследовать влияние интерлейкина 5 и рекомбинантного рецептора интерлейкина 5 на сократительные реакции гладких мышц бронхов морских свинок в условиях формирования гиперреактивности воздухоносных путей.

4. Методом математического моделирования исследовать кинетические параметры сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей в условиях формирования бронхиальной гиперреактивности.

Научная новизна:

Показано, что при сенсibilизации овальбумином морских свинок формируется гиперреактивность воздухоносных путей, которая проявляется в повышении сократительных реакций на холинэргические и гистаминергические воздействия.

Впервые показано, что предсокращающие факторы способны модулировать адренергические сократительные реакции деэпителизированных сегментов воздухоносных путей сенсibilизированных

животных: в условиях предсокращения гистамином адренергическая реактивность не изменялась, а использование гиперкалиевого раствора Кребса в качестве предсокращающего фактора угнетало адренергическое расслабление сегментов.

Показано, что влияние эпителия на адренергические реакции интактных животных зависит от характера предсокращающих факторов: потенциация при предсокращении гистамином и угнетение при предсокращении гиперкалиевым раствором Кребса. В условиях формирования гиперреактивности респираторный эпителий утрачивает способность модулировать сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей, которая у интактных животных проявляется угнетением сократительных реакций на гистаминергические воздействия и потенцированием их на холинергические воздействия.

Показано, что при инкубации гладкомышечных сегментов воздухоносных путей с интерлейкином 5 усиливаются сократительные реакции на гистаминергические воздействия, уменьшается степень расслабления на адренергические воздействия как у интактных, так и у сенсibilизированных животных.

Впервые показано, что растворимая субъединица рекомбинантного рецептора интерлейкина 5 дозозависимо снижает эффект экзогенного интерлейкина 5, а инкубация с рецептором сегментов сенсibilизированных (но не интактных) животных подавляет гистаминергические сократительные реакции.

С помощью метода математического моделирования показано, что сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей могут быть описаны системой кинетических уравнений обратимой химической реакции между лигандом и мембранным рецептором, сопровождающейся образованием комплекса лиганд-рецептор. Увеличение максимальной амплитуды ответа и сродства лиганда к рецептору отмечается после удаления респираторного эпителия, в условиях формирования сенсibilизации при

условии сохранности эпителиального слоя и при инкубации с интерлейкином 5 независимо от сохранности эпителия. Снижение максимальной амплитуды сокращения и сродства лиганда к рецептору отмечается при инкубации сегментов сенсibilизированных животных с α -субъединицей рецептора интерлейкина 5.

Научно-практическая значимость:

Результаты исследования вносят вклад в развитие фундаментальных представлений о механизмах локальной и дистантной регуляции сократительной активности гладкомышечных органов в условиях нормы и патологии. Полученные результаты позволяют определить перспективные направления поиска новых способов фармакологической коррекции расстройств респираторной системы. Разработанный способ оценки гиперреактивности воздухоносных путей у экспериментальных животных используется в Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ.

Результаты исследования внедрены в педагогический процесс на кафедре нормальной физиологии СибГМУ при преподавании курса «Физиология системы дыхания» и на кафедре биофизики и функциональной диагностики СибГМУ при преподавании курсов «Биофизика органов дыхания», «Биофизика гладких мышц», «Биофизика рецепции», «Внутриклеточные сигнальные системы». Модель бронхиальной астмы используется в научных исследованиях лаборатории биохимии ЦНИЛ Сибирского государственного медицинского университета.

Апробация работы. Основные результаты диссертации обсуждены: на Пироговской научной конференции студентов - Томск 2000, Втором конгрессе молодых учёных и специалистов «Научная молодёжь на пороге XXI века» - Томск 2001, на Пироговской научной конференции студентов - Томск 2001, на Конференции, посвященной 150-летию член.-корр.,

профессора А.С. Догеля - Томск СГМУ 2002, III Международном конгрессе молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» - Томск 2002, IV Съезде физиологов Сибири с международным участием - Новосибирск 2002, 12 Национальном Конгрессе по болезням органов дыхания - Москва 2002, , IV Международном конгрессе молодых учёных и специалистов «Науки о человеке» - Томск 2003, на Всероссийской научно-практической конференции «Электронные средства и системы управления» - Томск 2003, на четвертой международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке».-Москва 2003г.

Основные результаты диссертации опубликованы в 22 печатных работах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сенсibilизация овальбумином морских свинок приводит к формированию гиперреактивности воздухоносных путей, которая проявляется в усилении сократительных реакций на холинэргические и гистаминергические воздействия. Адренергические сократительные реакции сегментов воздухоносных путей сенсibilизированных животных зависят от предсокращающего фактора: в условиях предсокращения гистамином адренергическая реактивность не изменяется, а при предсокращении гиперкалиевым раствором Кребса- угнетается.

2. В условиях формирования гиперреактивности воздухоносных путей эпителий утрачивает способность модулировать сократительные реакции гладких мышц бронхов, которая у интактных животных проявляется в угнетении сократительных реакций на гистаминергические воздействия, потенциации - на холинэргические и уменьшении степени расслабления на адренергические воздействия.

3. Инкубация гладкомышечных сегментов воздухоносных путей с интерлейкином 5 потенцирует сократительные реакции на гистаминергические воздействия, уменьшает степень расслабления на

адренергические воздействия как у интактных, так и у сенсibilизированных овалбумином животных. Рекомбинантный рецептор интерлейкина 5 (растворимая фракция) дозозависимо угнетает эффект интерлейкина 5, а инкубация с рецептором сегментов сенсibilизированных (но не интактных) животных подавляет гистаминергические сократительные реакции.

4. Увеличение максимального сокращения и сродства рецептора к лиганду отмечается после удаления респираторного эпителия, а так же в условиях формирования сенсibilизации при сохраненном эпителиальном слое и при инкубации сегментов с интерлейкином 5. Снижение максимальной амплитуды сокращения и сродства рецептора к лиганду отмечается при инкубации сегментов сенсibilизированных животных с α -субъединицей рецептора интерлейкина 5.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», описания собственных результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 38 рисунками. Список литературы содержит 189 источников, из них 65 отечественных и 124 иностранных.

ГЛАВА I

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Физиологические особенности гладких мышц воздухоносных путей

Воздухоносные пути (ВП) (трахея и бронхи) представляют собой полые трубчатые образования, стенка которых состоит из слизистой оболочки, подслизистой основы, волокнисто-мышечно-хрящевой и соединительнотканной оболочек. Их скелетом являются хрящевые полукольца [3]. Гладкомышечные клетки, образующие среднюю оболочку, собраны в пучки и расположены слоями (от 3 до 8 в зависимости от диаметра). У половозрелых животных в прослойке соединительной ткани по периферии кластеров ГМК располагаются автономные нервные пучки. ГМК, входящие в состав стенки бронхов, имеют хорошо развитые нервно-мышечные связи, сочетающие локальную иннервацию отдельных миоцитов с дистантным медиаторным воздействием. В гладкой мышечной ткани есть так называемые ключевые клетки, имеющие плотные соединения с варикозными расширениями нервных волокон. Остальные клетки, не имеющие прямой иннервации, получают потенциал за счет электротонической связи с ключевыми клетками и путем дистантного обеспечения медиаторным влиянием [28].

Размеры ГМК воздухоносных путей составляют - от 50 мкм до 80 мкм [51]. Сарколемма, ограничивающая ГМК, состоит из плазматической и базальной мембран и образует значительное количество caveол. ГМК образуют многочисленные электрические контакты типа нексусов, чем и обуславливаются в значительной степени кабельные свойства гладкомышечных органов, характерные для физиологического синцития [51].

В покое сарколемма проницаема преимущественно для ионов калия,

однако ионы натрия так же принимают участие в формировании потенциала покоя. Значительный вклад в генерацию потенциала покоя вносит также электрогенная компонента активного транспорта [51].

Сократительный аппарат ГМК представлен миофибриллами, занимающими большую часть объема клетки. Они состоят из сократительных белков – актина и миозина. Существенной особенностью ГМК является отличие миозина последней от миозина скелетных мышц: АТФ-азная активность миозина ГМК на порядок ниже, чем миозина поперечно-полосатой мышцы, вследствие чего ГМ сокращается медленнее. Миозин включает в себя 2 лёгкие и 2 тяжелые цепи – щелочная и ДТНБ-цепь. Актомиозиновый комплекс способен гидролизовать АТФ лишь после фосфорилирования ДТНБ-цепи посредством кальций-кальмодулин-зависимой киназы лёгких цепей миозина. Для запуска этой реакции необходимо, чтобы концентрация Ca^{2+} в цитоплазме достигла уровня 10^{-6} – 10^{-5} Моль/л. Ионы Ca^{2+} могут освобождаться из внутриклеточных депо (их в ГМК немного – цитоплазматический ретикулум развит слабо) и поступать из внеклеточной среды через Ca^{2+} -каналы [150]. В этом случае наступает сокращение. В гладких мышцах трахеи его запас достаточен для реализации однократного полноценного сокращения [8]. При снижении концентрации ионов кальция в клетке происходит расслабление гладкой мышцы [51, 136].

Электрофизиологические исследования, проведенные на мышечных полосках и сегментах бронхов показали, что ГМ, как правило, не проявляют спонтанной активности, а на деполяризацию отвечают только локальным возбуждением [60, 110]. Амплитуды этих ответов варьируют в широких пределах.

В фазу деполяризации потенциала действия бронхиальных ГМК вовлекаются два основных механизма: один обусловлен увеличением натриевой проводимости, другой - кальциевой. Данные литературы [105, 123] свидетельствуют, что их количественное соотношение зависит от диаметра бронхов, объекта исследования и физиологического состояния органа. В

абсолютном большинстве случаев превалирует входящий кальциевый ток.

Каналы входящего тока в мембране респираторных ГМК представлены в основном потенциалозависимыми кальциевыми каналами. Эти каналы являются медленными, о чем свидетельствует достаточно высокий (-50 мВ) порог активации и большая константа времени. По кинетике инактивации выделяют как минимум два типа каналов - инактивирующиеся и неинактивирующиеся [117].

Обширный и физиологически важный класс Ca^{2+} каналов - рецепторуправляемые - не участвует в генерации ПД. Они открываются при воздействии биологически активных веществ.

Каналы выходящего тока в мембране ГМК воздухоносных путей характеризуются большим разнообразием. Наряду с калиевыми каналами задержанного выпрямления, обеспечивающими фазу реполяризации ПД, описаны Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы. Для активации последних необходимы ионы кальция [41]. Проницаемость этих каналов в респираторных ГМК модулируется цГМФ-зависимыми протеинкиназами [67].

В бронхиальных ГМК констрикторный эффект кальция опосредуется кальций-связывающим белком кальмодулином (КМ), свойства которого были описаны Cheung W. [78]. Это кислый гидрофильный глобулярный белок, имеющий четыре центра связывания с кальцием [33, 39]. Селективность его не абсолютна: он способен взаимодействовать и с другими катионами [84]. Результатом активации КМ является экспонирование на поверхности глобулы гидрофобных зон, которые контактируют с исполнительными системами. Последние представлены Ca^{2+} -КМ-зависимыми протеинкиназами [33, 39]. Эффекты кальмодулина блокируются многими гидрофобными веществами [8, 9].

Кроме ионных каналов в поддержании ионного гомеостаза гладких мышц дыхательных путей принимают участие системы активного транспорта, к которым относятся ионообменники и АТФазы. Они

осуществляют обмен ионов между цитоплазмой и средой, а также между отдельными компартментами клетки. Наибольшую физиологическую роль играют Na/K АТФаза, Ca²⁺ АТФазы сарколеммы и кальциевых депо, Na/Ca²⁺ обменник [123]. Ca²⁺ АТФаза ГМК электронейтральна, активность ее регулируется при участии цАМФ и Ca²⁺ [40]. Na/Ca²⁺ обменник в ГМК бронхов так же не подвержен влиянию мембранного потенциала и регулируется посредством внутриклеточных мессенджеров [34].

В регуляции сократительной активности гладких мышц дыхательного тракта важную роль играют вторичные мессенджеры, которые передают сигналы в клетке, такие как Ca²⁺-зависимая сигнальная система, цАМФ, цГМФ, инозитолтрифосфат (ИТФ), диацилглицерол (ДАГ), арахидоновая кислота и окись азота [46].

Эффекты активации Ca²⁺-зависимой сигнальной системы весьма многочисленны и обусловлены действием Ca²⁺-КМ-зависимых протеинкиназ, субстратом которых, в частности, являются киназы легких цепей миозина [26]. Среди других важных эффектов Ca²⁺ в ГМК воздухоносных путей следует прежде всего отметить инактивацию потенциалзависимого входа кальция [44, 177], стимуляцию фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов [107, 179], активацию Ca²⁺-зависимой K⁺-проводимости [44].

Эффекты цАМФ-зависимой сигнальной системы в ГМК воздухоносных путей противоположны кальциевой. Активация аденилатциклазы (АЦ) форсколином [8, 112], введение в клетку цАМФ [102] либо каталитической субъединицы ПК-А [143], а так же подавление активности фосфодиэстеразы [111], приводят к гиперполяризации мембраны и снижению механического напряжения.

В литературе описаны два основных пути реализации эффектов цАМФ-зависимой сигнальной системы в ГМК. Первый связывают с цАМФ-зависимым фосфорилированием киназы ЛЦМ и, как следствие, снижением сократительной активности мышц [132]. Второй механизм заключается в

цАМФ-зависимой активации калиевой проводимости плазмалеммы и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена [52]. Развивающаяся при этом гиперполяризация мембраны уменьшает потенциалзависимый вход ионов кальция и, как следствие, снижает сократительную активность ГМК.

Данные, имеющиеся в литературе [8] позволяют утверждать, что в бронхиальных ГМК реализуются оба вышеописанных механизма. Преобладание того или другого определяется типом гладких мышц и их функциональными особенностями. В гладких мышцах воздухоносных путей отмечается значительный вклад гиперполяризации в цАМФ-зависимое расслабление [111].

Циклический гуанозинмонофосфат также рассматривается, как вторичный мессенджер. Предполагается, что цГМФ-зависимые протеинкиназы способны активировать удаление ионов Ca^{2+} из клетки [46, 84] во внеклеточную среду, эндоплазматический ретикулум, митохондрии, ограничивать поступление этих ионов в клетку и осуществлять регуляцию фосфоинозитидного цикла. В ГМК трахеи цГМФ-зависимая протеинкиназа 1a активирует Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы [67].

Гуанилатциклазная и аденилатциклазная системы как и любые другие системы вторичных посредников имеют механизм прерывания сигнала. Это осуществляется с помощью фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов (ФДЭ). Существует по меньшей мере 5 типов данного фермента в клетке [158].

Имеются многочисленные указания, что ИТФ опосредует мобилизацию кальция из немитохондриальных депо, индуцируемую различными воздействиями, во всех типах гладких мышц, включая ГМК дыхательных путей [141].

Диацилглицерол (ДАГ) активирует ПК-С в присутствии Ca^{2+} и фосфатидилсерина [7]. Данные относительно эффектов ПК-С в ГМК воздухоносных путей весьма противоречивы. Имеются сообщения как о

стимуляции [141], так и о подавлении [124] сократительной активности сегментов, взятых от различных видов животных, и даже от возрастной зависимости [156]. Так, ПК-С принимает участие в сократительных реакциях ГМК трахеи морских свинок на гистамин, серотонин и гиперкалиевый раствор, но не ацетилхолин [87].

Установлено, что повышение уровня Ca^{2+} приводит к активации NO-синтазы - фермента, участвующего в окислении гуанидинового азота L-аргинина до окиси азота, и эта реакция опосредована через взаимодействие Ca^{2+} с КМ. Под влиянием NO осуществляется активация растворимой ГЦ и увеличение уровня цГМФ. Считают, что в легких людей с бронхиальной астмой возможна индукция синтазы окиси азота цитокинами [5].

Известны, по крайней мере 2 изоформы синтазы окиси азота: эндотелиальная и нейрональная. Различают также конститутивную и индуцируемую формы этого фермента [97].

Существуют данные о том, что NO/цГМФ путь вовлечен в регуляцию реактивности ГМК трахеи и бронхов. Подавление активности ГЦ в изолированной трахее морских свинок может быть ответственно за гиперреактивность к гистамину. Любое препятствие в активности этой ферментной системы может принимать участие в патогенезе гиперреактивности дыхательных путей [151].

Существенную роль в регуляции функциональной активности ГМК респираторного тракта играют также аутокринные факторы (эйкозаноиды) - продукты метаболизма арахидоновой кислоты [96]. И хотя взгляд на них, как на самостоятельную сигнальную систему остается спорным, их вклад в физиологические и патологические реакции ГМК бронхов не вызывает сомнений. Оперирруя внутри клетки, все сигнальные системы постоянно оказывают взаимное влияние [9]. Проблема взаимодействия вторичных мессенджеров до сегодняшнего дня остается предметом интенсивного изучения.

Регуляция механического напряжения ГМК реализуется посредством гормональных и медиаторных воздействий на гладкомышечные клетки. Холинергические, адренергические, пептидергические и другие медиаторные системы участвуют в этом процессе как непосредственно, так и взаимодействуя друг с другом [55].

На мембране ГМК воздухоносных путей представлены различные классы рецепторов к БАВ. Высока плотность мускариновых M_1 -холинорецепторов, оказывающих активирующее действие на сократительную активность бронхов. Механизмы реализации бронхоконстрикторного эффекта связаны с инициацией рецепторуправляемого входа кальция в ГМК [2, 104] и активацией фосфолипазы С - ключевого фермента сигнальной системы, связанной с метаболизмом мембранных фосфоинозитидов. Имеются также сообщения [2] о способности M_2 -холинорецепторов бронхов ингибировать аденилатциклазу сарколеммы.

В различных отделах респираторного тракта наблюдается неодинаковая экспрессия подтипов мускариновых рецепторов. В ГМК трахеи собак преобладают мускариновые рецепторы M_2 -подтипа, содержание которых значительно превышает таковое в бронхах и в периферическом легочном эпителии, и небольшое количество рецепторов M_3 -подтипа. В бронхах обнаруживались холинорецепторы M_3 - и M_2 -подтипов, а в легочном эпителии - рецепторы подтипа M_3 .

Гистаминергические воздействия на гладкие мышцы бронхов так же носят констрикторный характер и реализуются посредством тех же механизмов, что и холинергические [49]. Имеются сообщения о наличии в мембране респираторных ГМК H_1 -, H_2 - гистаминергических рецепторов [113].

Гистамин в равной степени суживает центральные и периферические бронхи человека и морских свинок [88]. У крыс ГМК трахеи весьма резистентны к констрикторному действию гистамина [30].

Существуют отдельные данные о том, что гистаминергические H-рецепторы опосредуют расслабление ГМК воздухоносных путей морских свинок. Среди возможных механизмов расслабления называют ингибирование холинергической нейротрансмиссии. Не исключается также роль эпителия [109].

Расслабляющее влияние на ГМК воздухоносных путей опосредуются преимущественно симпато-адреналовой системой. При исследовании действия адреномиметиков на сократительную активность изолированных ГМК трахеи крысы было установлено, что α -адренорецепторы расположены на эффекторных нейронах интрамуральных вегетативных ганглиев, в то время как β -адренорецепторы в мембране ГМК [1]. Предполагается, что адренергические нервные волокна оканчиваются как на ГМК, так и на нейронах интрамуральных ганглиев воздухоносных путей крысы. Видовые особенности адренергической регуляции тонуса бронхов связаны с преобладанием β_2 -субтипа у человека, морской свинки, свиньи [2] и β_1 -субтипа - у крыс, кроликов, собак [49].

Бронхорасслабляющее влияние катехоламинов реализуется через активацию аденилатциклазы, с которой β -рецепторы сопряжены посредством G_s -белка. Кроме того, при стимуляции β -адренорецепторов ГМК воздухоносных путей происходит перераспределение ионов Ca^{2+} в цитозоле [95, 184].

Чувствительность гладких мышц воздухоносных путей к расслабляющему действию β -адреномиметиков зависит от исходного тонуса и типа вещества, используемого для тонизирования *in vitro* [171].

Также имеются сообщения, что *in vitro* ГМК бронхов отвечают сокращением на воздействие эндотелина [126], серотонина, пуриновых

оснований [49]. Пурины способны потенцировать бронхоспазм, вызываемый гистамином, причем это потенцирование опосредуется неадренергическими, нехолинергическими нервами. При различных видах бронхоспазма эффекты аденозина реализуются через стимуляцию различных типов пуриновых рецепторов. На уровне трахеи и бронхов чувствительность ГМК к пуринам различается [83].

Важная роль в регуляции тонуса респираторных ГМК принадлежит также так называемой неадренергической, нехолинергической (НАНХ) системе. Для дыхательных путей человека характерно НАНХ-зависимое расслабление бронхов, связанное с накоплением цГМФ в бронхиальных стенках. Накопление данного мононуклеотида препятствует снижению активности NO-синтазы. *In vitro* ингибиторы данного фермента потенцируют холинергический спазм бронхов человека [121, 160].

Было показано различие в НАНХ-зависимой реакции ГМК трахеи и главных бронхов морских свинок на фоне электростимуляции. При этом снижение тонуса главных бронхов происходит за счет образования NO и высвобождения вазоактивного интестинального полипептида. В трахее же сократительный ответ на электростимуляцию усиливается посредством неидентифицированного пока механизма [129, 187].

В дыхательных путях продуцентами NO являются сенсорные нервные волокна, эндотелиальные клетки, клетки эпителия и участвующие в воспалительных реакциях клетки, экспрессирующие конститутивную и (или) индуцируемую NO-синтазу, причем в индукции фермента могут участвовать разные цитокины. У человека с NO связано, в частности, расширение бронхов без участия адренергических или холинергических рецепторов, блокирование вызываемого гистамином бронхоспазма. Гиперреактивность бронхов вирусной и аллергической этиологии у морских свинок коррелирует с недостаточностью конститутивной NO-синтазы и может быть устранена низкими дозами L-аргинина [137].

Несмотря на то, что многими авторами показана протекторная роль окиси азота, есть данные, что NO способна вызывать клеточные повреждения, характерные для бронхиальной астмы [5].

Большое значение в регуляции функций дыхательных путей играют нейропептиды. Субстанция Р вовлекается при заболеваниях легких, влияя на бронхоконстрикцию. У морской свинки и человека этот нейропептид содержится в эндотелии бронхиальных микрососудов, в субэпителиальных и экстрабронхиальных областях трахеи и крупных дыхательных путей. В воздухоносных путях кролика субстанция Р повышает высвобождение ацетилхолина нервными окончаниями. Вазоактивный интестинальный пептид блокирует этот эффект [176].

Важная роль в регуляции тонуса воздухоносных путей принадлежит метаболитам арахидоновой кислоты. Доказана бронхопротекторная роль эндогенного ПГ E2. Существует зависимость уровня ПГ F2, 6-кето-ПГ F1 и тромбоксана B2 в плазме крови от фазы и тяжести течения бронхиальной астмы [25]. Продукты липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты лейкотриены C4, D4 и E4 в гладкой мускулатуре бронхов у собак оказывают влияние как на гладкие мышцы, так и на нервный аппарат. Синтезируются лейкотриены в бронхах, там же имеются соответствующие рецепторы в клетках гладких мышц. В нормальных условиях при действии ЛТ4 C4 и D4 сокращения ГМК не происходит вследствие ингибиторного действия ПГ E2 и ПГ J2. Тромбоксан A2 способен вызывать гиперреактивность гладких мышц на ацетилхолин в бронхиолах, но не в трахее собак [165, 181].

Сократительные простаноиды и пептидные лейкотриены, к которым относятся ЛТ C4 и E4, являются возможными медиаторами тонуса в покое для трахеи морской свинки и для бронхов человека [119].

На сократительную активность ГМ воздухоносных могут также влиять различные факторы, вырабатываемые эпителием. В настоящее время

установлено, что эпителиальные клетки дыхательных путей выступают как эффективные паракринные железы, продуцирующие биологически-активные вещества (БАВ) - эйкозаноиды, кислородные радикалы, цитокины [81]. Среди эпителиальных клеток на роль регуляторов тонуса подлежащих ГМК претендуют так называемые клетки Кульчитского, относящиеся к специализированным клеточным элементам трахеобронхиального эпителия.

Было показано, что клетки Кульчитского могут участвовать в регуляции тонуса гладкой мускулатуры бронхов, выработке биогенных аминов (гистамина и 5-НТ), кининов. Функция этих клеток не до конца ясна и, вероятно, неодинакова на разных уровнях воздухоносных путей [12].

Установлена выработка эпителием релаксирующего фактора, на роль которого претендуют продукты липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты и (или) окись азота [145, 160]. Вместе с тем, многие аспекты эпителиально-гладкомышечных отношений находятся на начальной стадии исследования.

В эпителиальных клетках дыхательных путей человека существуют α_1 -адренорецепторы, опосредующие мобилизацию кальция [49] и метаболизм мембранных фосфоинозитидов [124]. Холинорецепторы легочного эпителия собаки представлены, в основном, M_3 -субтипом.

Формирование системы эпителий-зависимой регуляции тонуса завершается к зрелому возрасту, а при старении эпителий утрачивает свою регуляторную функцию [31]. Механическое удаление эпителия усиливает реактивность ГМК воздухоносных путей на серотонин, карбахолин, гистамин [139] и электростимуляцию [120].

Есть основания полагать, что в мембранах эпителиальных клеток представлены рецепторы ко всем группам БАВ, однако литературные данные, касающиеся этого вопроса, крайне несистематизированы.

1.2. Экспериментальные модели в изучении механизмов развития бронхоспастических состояний

Механизмы развития бронхоспастических состояний и пути их коррекции активно изучаются во всем мире, но проблема бронхиальной астмы остается далекой от разрешения. Несмотря на достигнутые успехи, за последние 30 лет в России в 3 раза увеличился уровень заболеваемости бронхиальной астмой (БА), около 5% взрослого населения и до 10% детей страдают этим заболеванием [18,57].

Изучение механизмов аллергического воспаления и гиперреактивности дыхательных путей, лежащих в основе БА, в эксперименте на животных позволяет глубже понять механизмы этих процессов у человека. Поэтому экспериментальные животные широко используются для изучения физиологии и патофизиологии дыхательных путей, включая исследование клеточного и гуморального ответа на введение аллергена.

В литературе описан целый ряд экспериментальных моделей бронхиальной астмы у животных, которые используются для изучения различных аспектов патогенеза и апробации новых способов лечения. В то же время каждая модель имеет определенные особенности, которые ограничивают сферу ее использования.

На сегодняшний день актуальность такого рода работ вновь возрастает в связи с обнаружением новых маркеров БА - в том числе цитокины, интерлейкин 5 (ИЛ-5) и т.д. – и, соответственно, новых направлений исследования патогенеза БА и поиска патогенетически обоснованных методов лечения.

1.2.1. Способы моделирования бронхоспастических состояний у экспериментальных животных

Еще в первой половине XX в. учеными было продемонстрировано, что у животных можно вызвать астмоподобные симптомы, применяя мускарин, пилокарпин [17]. Meltzer в 1910 г. отметил сходство проявлений анафилаксии у морских свинок и бронхиальной астмы человека и предложил этих животных в качестве удобной модели для изучения бронхиальной астмы. С тех пор морская свинка твердо укрепила свои позиции в экспериментальной аллергологии [17], и в наше время большинство зарубежных и отечественных ученых используют именно это животное при моделировании бронхиальной астмы. Кроме морских свинок в качестве объекта исследования используют кроликов, мышей, крыс, кошек и обезьян. У всех этих животных шоковым органом при анафилаксии являются легкие.

В качестве антигена используются овальбумин, лошадиная сыворотка, пневмоцитотоксическая сыворотка. Разработано несколько моделей с их использованием.

В 1937 г. Каллос и Пэйджл сенсibilизировали морских свинок чужеродным белком, а затем подвергали их действию аэрозоля из 10-20% раствора того же белка [47].

Разовская Е.С. и Штеренсон Ф.Н. [47] сенсibilизировали трехкратно морских свинок весом 200 – 400 г подкожными инъекциями 0,2 – 0,4 мл 25% взвеси яичного белка в физиологическом растворе (промежутки между инъекциями 3 – 4 дня). Через 14 – 21 день животные помещались в камеру и подвергались действию аэрозоля из этой же взвеси. Спустя несколько минут после начала ингаляции у морских свинок появляется экспираторная одышка. Затруднение дыхания нарастает в течение ближайших минут, и животное гибнет в асфиксических судорогах, если контакт с антигеном не прекращается. Повторная ингаляция на выживших морских свинок влияния

не оказывает. При вскрытии наблюдается сильная эмфизема с участками ателектаза, густой, вязкий секрет с фибриноидными свертками в просвете бронхов. При гистологическом исследовании обнаруживается массивная инфильтрация эозинофилами перибронхиальной ткани, межальвеолярных перегородок и подслизистой бронхов.

В модели бронхиальной астмы по Andersson P. (1980 г.) [27] группу белых крыс-самцов весом 180 – 200 г два дня подряд надо сенсibilизировать подкожным введением 10 мкг овальбумина, разведенного в 0,5 мл раствора, содержащего 100 мг Al(OH₃). Три недели спустя ингалировать разрешающую дозу 0,03% овальбумина в концентрации 0,8 мл/мин – 1 до появления признаков бронхоспазма.

Существуют различные модификации метода Andersson, например, на мышах. Мыши активно иммунизируются в первый и четырнадцатый день внутрибрюшинными инъекциями 100 мкл физиологического раствора, содержащего 20 мкг овальбумина и 2 мг алюминия. На 24, 25 и 26 дни мыши подвергаются действию аэрозоля – 1% овальбумина в физиологическом растворе, в течение 20 минут [100, 115].

В других исследованиях предлагается иная схема моделирования: в первый день мышей внутрибрюшинно сенсibilизируют инъекциями раствора с 10 мкг овальбумина и 1 мг гидроксида алюминия. С 14 по 21 день ежедневно проводят ингаляции овальбумином [142].

По методу Желтвая В.В. в модификации Бабича В.И. [62] в качестве антигена используется нормальная лошадиная сыворотка. Морские свинки сенсibilизируются 0,1 мл нормальной лошадиной сыворотки внутрибрюшинно. Затем 0,1 мл лошадиной сыворотки с убитой вакциной БЦЖ вводится трижды подкожно с интервалом в 24 часа. Следующие 14 дней морские свинки подвергаются ингаляции лошадиной сывороткой в течение 30 минут в камере (1,0 мл сыворотки на каждое животное). По

истечении этого срока на 21 и 28 день сенсибилизации опять проводятся ингаляции.

Кроме лошадиной сыворотки применяли также свиную сыворотку. Ее вводили кроликам трехкратно 1 раз в неделю под кожу в дозе 1 мл/кг. Через 7 дней та же доза антигена, вводимая внутривенно, вызвала аллергическую реакцию [6].

Нормальная сыворотка может быть использована как антиген для сенсибилизации кошек. Подопытным животным три дня подряд подкожно вводят по 0,1 мл/кг массы тела нормальную сыворотку. Аллергический бронхоспазм можно получить введением разрешающей дозы антигена (1 мл/кг) на 12 день от начала иммунизации [19].

На кроликах разработана модель бронхиальной астмы с использованием пневмоцитотоксической сыворотки. Донорами сыворотки являются крысы, их иммунизируют экстрактом легких кролика. Получают сыворотку, титр которой в реакции связывания комплемента: ++++ в разведении 1:80. Полученную сыворотку вводят 6 раз внутривенно и дважды в виде ингаляции аэрозолем с интервалом в три дня в дозе 0,3 мл на 1 кг веса животного. При гистологическом исследовании легких: мелкие бронхи спазмированы, многие просветы альвеол эмфизематозы, в некоторых участках ткань находится в состоянии гиповентиляции или ателектаза. В некоторых ателектических участках – очаговые кровоизлияния и скопление лейкоцитов – преимущественно эозинофилов. Межалвеолярные перегородки утолщены и инфильтрированы гистиоцитами и эозинофилами, стенки многих артерий утолщены [14].

В экспериментах на обезьянах в качестве антигена применяли экстракт *Ascaris suum*. Ингаляция животных этим экстрактом вызывала типичную IgE-опосредованную реакцию гиперчувствительности, с дегрануляцией тучных клеток и бронхоконстрикцией [189].

Некоторые исследователи для сенсibilизации животных использовали разведенный в изотоническом растворе хлорида натрия с равным количеством вазелинового масла белок куриного яйца (1:5). Этот раствор вводили подкожно по 0,5 мл, крысам-самцам массой 0,18 – 0,22 кг [15].

Исследования, выполненные на экспериментальных моделях, позволили получить целый ряд новых данных о патогенезе бронхиальной астмы, о вовлечении отдельных звеньев иммунной системы, морфо-функциональных параллелях и метаболических расстройствах при данном заболевании.

1.2.2. Патоморфология легких при моделировании бронхоспастических состояний у животных

Наибольшее число работ, выполненных на экспериментальных моделях БА, посвящены изучению морфологических изменений, происходящих при развитии этого патологического состояния.

На моделях БА на морских свинках и кроликах с использованием в качестве антигена овальбумина и пневмоцитотоксической сыворотки было выявлено увеличение эозинофилов, лимфоцитов в крови, в бронхоальвеолярной жидкости и в ткани легкого. Средняя толщина стенки трахеи также, определяемая микрометрическим методом, так же была увеличена [75, 154].

Описанные изменения характерны для воспалительного процесса, который сопровождает развитие БА в легких экспериментальных животных и к тому же характеризуется интенсивной инфильтрацией эозинофилов, особенно в фазу поздней реакции астматического ответа [134]. Эозинофильная инфильтрация продолжается до 48 часов после провокационной ингаляции антигеном, при этом обнаруживается временное

увеличение ряда апоптотических клеток и ядерного антигена в альвеолах [154].

Также при гистологическом изучении легких зафиксировано увеличение уровня гиалина в плазме, в бронхоальвеолярной жидкости, и в легочной ткани [94, 154].

В модельных исследованиях *in vitro*, было показано, что очищенные продукты эозинофилов и стимулированные эозинофилы повреждают респираторный эпителий [75, 82]. Большой основной протеин, к примеру, вызывает отслоение эпителиальных клеток и нарушает движение ресничек, обнажая базальную мембрану. Исследование бронхиальной ткани методом иммунофлюоресценции выявляет депозиты большого основного протеина в местах повреждения эпителия. Повреждение эпителия, вызываемое продуктами эозинофилов, может приводить к повышению проницаемости слизистой и нарушению ее осмолярности. При этом за счет воздействия на афферентные чувствительные окончания нервов может увеличиваться высвобождение нейропептидов, таких как субстанция П, которые обладают потенциальной бронхоконстрикторной активностью [74]. Десквамация и деструкция клеток дыхательного эпителия могут также приводить к потере продуцируемого эпителием релаксирующего фактора, вызывающих гиперчувствительность гладких мышц бронхов [75, 189].

В биоптатах кожи морских свинок с бронхиальной астмой были обнаружены электронномикроскопические изменения. В условиях сенсibilизации в дерме морских свинок отмечена дезорганизация ее составных элементов, проявляющаяся незначительным расслоением ультраструктур на электронносветлые и электронноплотные компоненты, повышенной насыщенностью лейкоцитами, Т-лимфоцитами, тучными клетками. Наблюдается разволокнение коллагеновых фибрилл, в отдельных случаях выявляется лизис коллагеновых волокон. В стенке капилляров отмечены нарушения контактов между эндотелиоцитами и разрушения базальной мембраны. В просвете капилляров обнаруживаются явления

гиперагрегации и гемолиза эритроцитов, выявляются «тени» эритроцитов и хлопьевидные массы белков. Во время приступа в дерме животных происходит резкое расслоение ультраструктур, в капиллярном русле выявляются сладжи эритроцитов, многие эритроциты неправильной формы и содержат разрыхленные и распадающиеся мембраны. Плазма крови представлена избытком электронноплотного хлопьевидного материала, обрывками цитоплазмы и разрушенными ядрами клеток [32].

Yang Z.W., Qin Y.H., Su S.R. [186] предложили для оценки морфологических изменений у морских свинок с БА использовать измерение *star volume* стереометрическим методом, у сенсibilизированных свинок этот объем был втрое выше, чем в контрольной группе.

Таким образом, проведено большое количество исследований, посвященных гистопатологическим и морфологическим изменениям при экспериментальной БА, надо отметить, что обнаруженные исследователями изменения в значительной степени сходны с патоморфологической картиной у больных БА.

1.2.3. Иммунологическая характеристика экспериментальной бронхиальной астмы

Иммунологическим аспектам БА уделяется большое внимание в модельных исследованиях на животных, однако в этом вопросе остается еще много неясного.

Некоторые исследователи отмечают увеличение ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИФγ в бронхоальвеолярной жидкости и в ткани легкого морских свинок, крыс с экспериментальной БА [99, 142]. Доказано, что при воздействии ИЛ-13 и ИЛ-8 у животных с моделью БА повышает гиперреактивность дыхательных путей на воздействие гистамина и их воспаление [131, 146]. У овалбумин сенсibilизированных мышей отмечается повышение уровня

IgE, IgG1. Изучение эффекта антител CD23 у CD23 дефицитных и CD23 избыточных мышей позволило снизить уровень IgE и IgG1, эозинофилии, нормализовать гиперреактивность бронхов у CD23 избыточных мышей. Эти изменения сопровождались повышением ИФ γ и снижением ИЛ-4 [100].

Martin Schuster с коллегами [157] изучали миграцию лимфоцитов в легочную ткань у овальбумин сенсibilизированных кроликов. Они обнаружили увеличение количества CD4, CD8, ИЛ-2, натуральных киллеров методом РИА в бронхоальвеолярной жидкости и в ткани легкого.

Поскольку у человека в клетках бронхиального эпителия NO повышает продукцию ИЛ-8, исследователями была сделана попытка, исследовать участие эндогенного оксида азота в воспалении и гиперреактивности воздухоносных путей в эксперименте, и вовлечение в этот процесс ИЛ-8 у морских свинок. При воздействии озоном в бронхоальвеолярной жидкости повышалось содержание нейтрофилов и ИЛ-8, а ингибитор NO-синтазы предотвращал эти изменения [146].

Проведенные исследования с использованием моноклональных антител к ИЛ-5 и рецептору ИЛ-5 показали, что анти-ИЛ-5 терапия, помимо редукции эозинофильного воспаления, может приводить к снижению гиперреактивности дыхательных путей при астме и улучшать функцию легких. Однако в исследованиях на морских свинках с экспериментальной бронхиальной астмой было замечено, что для блокирования гиперреактивности дыхательных путей необходимы более высокие дозы препаратов моноклональных антител к ИЛ-5, чем для блокирования эозинофильного воспаления [89, 140].

Более того, было показано, что для развития бронхиальной гиперчувствительности критичными являются ИЛ-5 и ИЛ-4, но не эозинофилы или IgE [71], то есть ИЛ-5 лиганд-рецепторное взаимодействие на гладких мышцах дыхательных путей может вызывать гиперчувствительность независимо от эозинофил-индуцированного повреждения тканей.

Wegner с коллегами [180] проводили исследование влияния адгезивных молекул на воспаление при БА. В эксперименте на обезьянах использовались моноклональные антитела к рецепторам адгезивных молекул. Было показано, что у животных уменьшается количество эозинофилов в бронхиальном дереве в ответ на ингаляцию аллергена. Также отмечалось достоверное ограничение повышения бронхиальной гиперчувствительности после аллергенного провоцирования. Это позволило предположить, что цитокины оказывают сильное влияние на адгезивные молекулы.

Электрическое стимулирование блуждающего нерва экспериментальных морских свинок вызывало как бронхоконстрикцию так и брадикардию. У контрольных животных, пилокарпин уменьшал вагус-зависимую бронхоконстрикцию, стимулируя нейрональные мускариновые рецепторы M_2 , а галламин потенцировал бронхоконстрикцию, блокируя эти рецепторы. У сенсibilизированных животных, которые не получали моноклональные антитела к интерлейкину 5 (МА-5), эти эффекты были заметно снижены, подтверждая дисфункцию рецептора M_2 . У морских свинок с экспериментальной БА на фоне введения МА-5 эффекты как пилокарпина так и галламина были такими же, как и у контрольных животных, демонстрируя нормальную функцию рецепторов M_2 . Введение МА-5 селективно тормозило миграцию эозинофилов в легкие, оцениваемую по составу бронхоальвеолярного лаважа [90].

На пассивно иммунизированных морских свинках было показано, что фактор активации тромбоцитов (ФАТ) - самый сильный хемотаксический фактор, и в реакциях *in vivo* увеличивает количество эозинофилов при аллергических реакциях. А назначение антагонистов ФАТ предотвращает эозинофильную инфильтрацию в легких свинок вызванную антигеном [125].

1.2.4. Метаболические расстройства при моделировании бронхиальной астмы в эксперименте

На морских свинках исследовались показатели функционального состояния кожи. Измерения проводились на предварительно депилированной коже живота животных в межприступный период, во время приступа и после приступа через 24 часа [64]. Перед измерением кожа протиралась ватой, смоченной дистиллированной водой. Контролем служили интактные животные. Во время приступа БА наблюдается сдвиг рН кожи в щелочную сторону ($7,09 \pm 0,12$ ($p < 0,05$), в контроле $6,63 \pm 0,07$), уменьшение величины окислительно-восстановительных потенциалов ($17,25 \pm 7,77$ мВ ($p < 0,05$), в контроле $50,38 \pm 6,69$ мВ) и удлинение времени обесцвечивания раствора щелочи ($56,61 \pm 5,81$ с ($p < 0,05$), в контроле $31,16 \pm 1,54$ с). Через 24 часа после приступа наблюдается дальнейшее изменение показателей. Эти данные свидетельствуют о нарушении трофических процессов в коже животных и снижении ее защитных свойств при модельном процессе бронхиальной астмы.

Также в опытах на свинках изучалась активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ), альфа-гидроксибутиратдегидрогеназы (альфа-ГБДГ), креатинфосфокиназы (КФК), щелочной фосфотазы (ЩФ), аланинаминотрансферазы (АлТ), аспартатаминотрансферазы (АсТ), гамма-глутамилтрансферазы (гамма-ГлТ) ткани легких при модельном процессе БА. Активность ферментов измерялась в ед/г белка. На высоте приступа активность ЛДГ оставалась на уровне внеприступного периода – $315,6 \pm 17,8$, активность гамма ГлТ была ниже контрольного уровня – $2,7 \pm 0,2$ ($p < 0,05$) (контроль – $4,6 \pm 0,3$). Наблюдалось снижение и других исследуемых ферментов: альфа-ГБДГ – $183,7 \pm 6,6$ ($p < 0,05$) (контроль $225,9 \pm 8,9$); КФК – $201,1 \pm 5,1$ ($p < 0,05$) (контроль – $391,7 \pm 17,7$); ЩФ – $63,7 \pm 1,2$ ($p < 0,05$) (контроль – $85,2 \pm 3,7$); АлТ – $3,7 \pm 0,1$ ($p < 0,05$) (контроль – $5,6 \pm 0,5$); АсТ – $98,4 \pm 4,9$

($p < 0,05$) (контроль – $126,8 \pm 5,8$). Выявленные изменения активности ферментов подтверждают представления об анаэробизации обмена веществ при аллергии [62].

Активность тех же ферментов изучались в коже морских свинок. Во внеприступный период наблюдалось уменьшение активности ферментов, во время приступа БА активность ферментов в коже увеличивалась [61].

Этими же авторами исследовалась активность ферментов сыворотки крови, ткани гипоталамуса и надпочечников морской свинки при БА. Было выявлено, что во внеприступный период активность альфа-ГБДГ и гамма-ГлТ сыворотки крови возрастала, активность КФК снижалась, во время приступа активность альфа-ГБДГ, гамма-ГлТ, АлТ и АсТ снижалась, а ЩФ и КФК повышалась. В ткани гипоталамуса во внеприступный период активность всех исследуемых ферментов (ЛДГ, КФК, ЩФ, АлТ, АсТ, гамма-ГлТ) снижалась, во время приступа активность всех ферментов повышалась. В ткани надпочечников во внеприступном периоде наблюдалось снижение активности ЩФ, АлТ и гамма-ГлТ, активность же КФК повышалась, во время приступа БА наблюдалось снижение активности ЛДГ, КФК, активность альфа-ГБДГ и гамма-ГлТ повышалась [65, 63].

На свинках с бронхиальной астмой, моделируемой по методу Желтвая-Бабича было показано, что уровень основного обмена у экспериментальных животных (оценивался по методу С.Н. Голубевой (1959), по потреблению кислорода на кг массы тела в сутки) повышен – $1324,1 \pm 30,4$ л/кг ($p < 0,01$) (контроль – $872,9 \pm 15,4$ л/кг), при проведении терапии церулоплазмином отмечено снижение до $1020,2 \pm 24,5$ л/кг [35]. Одним из механизмов эффективности влияния церулоплазмина при БА является стимуляция окислительных процессов и повышение, тем самым, основного обмена. При экспериментальной БА в крови понижается концентрация адреналина – $0,23 \pm 0,02$ мкг/л ($p < 0,001$) (контроль – $0,43 \pm 0,02$ мкг/л) и норадреналина –

0,80±0,02 мкг/л ($p<0,05$) (контроль - 1,12±0,03 мкг/л), эти показатели так же нормализуются при терапии церулоплазмином [45].

На сенсibilизированных крысах-самцах было выявлено уменьшение содержания в легочной ткани общего глутатиона с 0,34±0,018 мМ/г до 0,11±0,08 мМ/г ($p<0,05$) на третий день сенсibilизации и возврат показателя к 21 дню к норме (0,39±0,002 мМ/г) [15].

Было определено, что развитие сенсibilизации у морских свинок сопровождается увеличением содержания общих липидов в сыворотке крови с максимальной выраженностью на 3 сутки сенсibilизации – до 13,2±0,6 мМ при контроле 4,8±0,3 мМ ($p<0,001$). На 3 сутки сенсibilизации содержание общих липидов в большинстве исследованных тканей (мозга, миокарда, легких, печени, тонкого кишечника, селезёнки, почек) было увеличено, причем наиболее существенно в ткани мозга (с 24,6±0,8 до 36,7±1,9 мкМ/г ткани, $p<0,001$) [11]. При этом содержание фосфолипидов в сыворотке крови уменьшается на 3 сутки на 28,1% от величины контроля, на 12 суток на 63,9% ($p<0,001$). В тканях динамика содержания фосфолипидов была различной: на 3 сутки в миокарде оно увеличивалось на 34%, в печени на 17,7 %, в почках на 39,2%, а в мозге, легких и селезенке, напротив, уменьшалось. На 12 сутки содержание фосфолипидов уменьшается во всех тканях за исключением почек [10].

При изучении содержания в крови фосфорсодержащих соединений у сенсibilизированных кроликов было выявлено уменьшение в процессе сенсibilизации неорганических фосфорсодержащих соединений: до сенсibilизации - 6,0±1,0 мМ, через 3 недели – 3,8±0,1 мМ ($p<0,05$). Количество органических фосфорсвязанных соединений, составляющих в норме 6,39±1,1 мМ, в первую неделю увеличивалось до 10,6±0,5 мМ ($p<0,05$), затем уменьшалось до 2,6±0,5 мМ ($p<0,05$) перед разрешающей инъекцией антигена. Содержание общего числа фосфорсвязанных соединений

уменьшалось вдвое: от $12,3 \pm 1,4$ мМ до эксперимента до $6,5 \pm 0,5$ мМ ($p < 0,05$) на 3 неделю после сенсibilизации [6].

При моделировании состояния гиперреактивности дыхательных путей у крыс-самцов с помощью ингаляционного введения аллергена (овальбумина) было обнаружено дозозависимое увеличение продукции окиси азота эпителиоцитами бронхов. С нарастанием степени повреждения эпителиального пласта увеличивается ферментативная активность его клеток [27].

1.2.5. Оценка бронхоконстрикторных и бронхолитических эффектов фармакопрепаратов на экспериментальных моделях

У сенсibilизированных морских свинок отмечается развитие гиперреактивности гладких мышц воздухоносных путей на воздействие гистамина. Некоторые исследователи считают, что усиление гистаминергических реакций ГМ бронхов связано с тонусом блуждающего нерва и основным большим протеином эозинофилов. В экспериментах на сенсibilизированных морских свинках выявлялось снижение гиперреактивности дыхательных путей на действие гистамина при ваготомии, блокировании притока эозинофилов и нейтрализации основного большого протеина эозинофилов [148].

На морских свинках также было изучено влияние ограничения питания на антиген-индуцированную бронхоконстрикцию, количество воспалительных клеток и уровни кортизола и катехоламинов в плазме крови. У голодающих животных были повышены уровни эпинефрина (на 30%) и кортизола (на 33%), но понижен уровень норэпинефрина, наблюдалось значительное понижение (на 60%) максимального бронхоконстрикторного ответа. У "сытых" и голодающих животных, которым вводили полиэтиленгликоль 400, наблюдалось снижение антиген-индуцированной бронхоконстрикции и эозинофилии [173].

Для изучения изменений электрических свойств гладкомышечных клеток (ГМК) у овальбумин-сенсibilизированных морских свинок были использованы стеклянные микроэлектроды [127]. Мембранный потенциал покоя (МПП) ГМК интактных животных составлял $-40,4 \pm 0,5$ mV. 27 % всех клеток показали регулярную спонтанную электрическую активность (амплитуда 2-20 mV). 44% клеток показали нерегулярные флуктуации МПП, а остальные клетки не показали электрической активности. Сенсibilизация животных вызывала небольшое, но значимое повышение ($p < 0,001$) МПП до $-43,1 \pm 0,9$ mV. Ежедневное ингалирование сенсibilизированных животных аэрозолем овальбумина в течение двух недель вызывало значительное уменьшение МПП до $-27,8 \pm 0,8$ mV ($p < 0,001$). Повторяющиеся ингаляции в течение пяти недель вызывали дальнейшее уменьшение МПП ГМК воздухоносных путей до $-22,6 \pm 0,7$ mV ($p < 0,001$). Ответы на гистамин (0,1 мМ) и изопреналин (5 мкМ) сопровождались изменением МПП, и были более выражены в воздухоносных путях сенсibilизированных свинок. Эти исследования подтверждают, что изменения электрической активности гладкомышечных клеток при БА может играть важную роль в патогенезе заболевания.

Распределение β -адренергических рецепторов в легких интактных морских свинок и свинок с экспериментальной бронхиальной астмой было исследовано с помощью ауторадиографического метода [133]. У свинок с БА плотность β -адренорецепторов в легочной ткани была понижена по сравнению с контролем: на 23,73% в гладких мышцах бронхиол, на 18,65% в гладких мышцах бронхов, на 23,53% в эпителии бронхиол, на 14,23% в эпителии бронхов и на 17,16% в альвеолярном эпителии. Снижение плотности адренорецепторов, хотя и не признается большинством авторов в качестве патогенетического механизма БА, может служить фактором, обуславливающим снижение чувствительности бронхов к катехоламинам.

Takizawa T. [167] показал, что новый антиаллергический препарат, 7-[3-[4-(2-хинолинилметил)-1-пиперазинил]-пропокси]-2,3-дигидро-4Н-1,4-бензоцианил-3-один (VUF-K-8788) ингибирует гиперплазию эпителиальных клеток воздухоносных путей, периваскулярный отек и эозинофильную инфильтрацию паренхимы легких овалбумин - сенсibilизированных морских свинок, а кроме того, адгезию эозинофилов на эндотелиальных клетках пупочной вены человека. Таким образом, ингибиторный эффект VUF-K-8788 на адгезию эозинофилов может способствовать предотвращению поздней фазы астматического периода и инфильтрации эозинофилами в экспериментальной модели БА на морских свинках.

На сенсibilизированных нормальной сывороткой кошках изучалось влияние препарата «Витурид» [19]. В условиях β -адренергического дисбаланса, вызванного пропранололом, значительно повышается реакция на специфический антиген. При этом «Витурид» устраняет гиперреактивность бронхиальных мышц, наблюдается и выраженный бронхолитический эффект препарата по сравнению с условиями ненарушенной β -адренергической иннервации. В основе такого действия «Витурида» лежит его способность повышать содержание циклического аденозинмонофосфата.

Циклоспорин А при его ингаляционном введении сенсibilизированным морским свинкам в концентрации 10 - 20 г/л снижает реактивность воздухоносных путей на воздействие гистамина и ацетилхолина, при этом уменьшалось количество эозинофилов в бронхоальвеолярном лаваже и при гистологическом исследовании обнаруживалось уменьшение эозинофильной инфильтрации эпителия, окружающей соединительной ткани бронхов и бронхиол [183].

1.3. Роль интерлейкина 5 в патогенезе бронхиальной астмы

В последние годы существенно расширились и углубились представления о регуляции тонуса ГМ бронхов как в норме так и при

патологии дыхательной системы. По мнению большинства исследователей, морфологическую и биохимическую основу гиперреактивности составляют изменения дыхательных путей, которые оцениваются как следствие хронического воспаления, вызванного продолжительным воздействием специфических и не специфических факторов окружающей среды. Морфологические изменения ВП характеризуются увеличением количества эозинофилов, тучных клеток и других изменений касающихся непосредственно эпителия, гладких мышц и т.д.

При этом считается, что основную роль в патогенезе бронхиального воспаления играют эозинофилы [132, 170], которые являются источником большого количества провоспалительных и токсических продуктов, приводящих к повреждению эпителия бронхов. В 1922 г. Ellis описал связь эозинофилии крови и тканей с бронхиальной астмой, Huber и Koessler обратили внимание на массивную эозинофилию крови и ткани легких больных, умирающих на высоте астматического статуса. Более того, Horn et al. в 1975 г. обнаружили у больных бронхиальной астмой обратимую корреляцию между количеством эозинофилов периферической крови и значением $ОФВ_1$ (объем форсированного выдоха за 1 секунду), реактивностью дыхательных путей и тяжестью заболевания [180].

Выяснение механизмов, лежащих в основе развития и поддержания воспалительного процесса при бронхиальной астме, которые, вероятнее всего, являются результатом сложного взаимодействия между различными воспалительными клетками и гуморальными факторами, является наиболее значимым для понимания патогенеза бронхиальной астмы. В последнее время все большее внимание уделяется изучению таких сигнальных систем. Для эозинофилов таковым является интерлейкин 5 (ИЛ-5).

ИЛ-5 является индуцибельным гликопротеином, секретируемым Т-клетками, тучными клетками, эозинофилами, базофилами и рядом других клеток.

Изначально была выявлена его роль в пролиферации В-клеточной линии мышей BCL-1 и активации продукции этими клетками иммуноглобулина М (IgM) [162]. В дальнейшем была продемонстрирована его биологическая активность в отношении клеток, относящихся к гемопоэтическим линиям. Как было показано ранее, ИЛ-5 обладает широким спектром биологической активности, играет ключевую роль в пролиферации, дифференцировке (включая терминальную), повышении жизнеспособности, активации и хемокинезе эозинофилов, активирует секрецию из гранул в зоне воспаления, он повышает генерацию гистамина и лейкотриена C₄ базофилами человека. В тимоцитах он вызывает экспрессию рецептора высокой аффинности ИЛ-2 [147], обеспечивает ИЛ-2-зависимую пролиферацию и дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов человека и мыши. Это также фактор роста и дифференцировки В-клеток у мышей, он вызывает пролиферацию предшественников В-клеток и их дифференцировку [153, 128, 166]. Мышиный ИЛ-5 также стимулирует продукцию и секрецию иммуноглобулина А (IgA) [84].

Так как его гиперпродукция связана с эозинофилией в дыхательных путях и повышенной секрецией эозинофилами биологически активных веществ, которые стимулируют сокращение гладкой мускулатуры бронхов, секрецию слизи, вызывают альтерацию эпителия дыхательных путей, дегрануляцию тучных клеток и базофилов, ИЛ-5 принимает непосредственное участие в развитии основных проявлений астмы. Результатом является повреждение окружающих тканей в ответ на действие провоспалительных факторов [178].

Недавно была продемонстрирована ассоциация полиморфизма С-703Т гена ИЛ-5 с atopической бронхиальной астмой [43]. Роль ИЛ-5 в процессе развития эозинофилии дыхательных путях была подтверждена с использованием моноклональных антител к ИЛ-5 [175, 80]. Исследования на трансгенных животных (нокаут-мышях по генам ИЛ-5, растворимого рецептора ИЛ-5 и животных с гиперэкспрессией этих генов) [94, 170, 185]

также подтверждают гипотезу о том, что именно ИЛ-5 является одним из ключевых цитокинов, участвующих в развитии атопического воспаления при бронхиальной астме.

Также на трансгенных мышах изучалась последовательность нерегулируемой экспрессии ИЛ-5, экспрессирующей человеческий фактор. Повышенная экспрессия ИЛ-5 сопровождается продолжительной кровяной и селезеночной эозинофилией и эозинофильной инфильтрацией в легких и кишечнике, при этом других повреждений тканей не обнаруживается [85]. *In vivo* введение антител к мышинному рецептору ИЛ-5 ингибирует эозинофилию в ИЛ-5 трансгенных мышах [106]. Экспрессия гена ИЛ-5 трансгенных мышей под контролем промотора металлотионеина имеет повышенный уровень ИЛ-5 в сыворотке крови, который повышается также при применении кадмия. У этих животных обнаруживается повышение уровней сывороточных IgM и IgA. Обработка кадмием сопровождается увеличением популяции Ly-1-положительных В-клеток в селезенке, которое считается следствием действия аутоантител. Сыворотка этих животных также содержит повышенную концентрацию полиреактивных анти-ДНК антител класса IgM. Изучение гена иммуноглобулина в ИЛ-5 трансгенных мышах показало, что ИЛ-5 поддерживает экспрессию В-клеток CD5, которые имеют внутриутробный тип гена иммуноглобулина [118]. Таким образом, ИЛ-5 может быть ответственным за пролонгацию периода незрелых CD5 (+)В-клеток, которые становятся позже CD5 (-) В-клетками, секретлируемыми полиреактивными естественными антителами.

Наконец, данные Salvi S. с соавторами и Nakonarson H. с соавторами показывают, что ИЛ-5 может продуцироваться непосредственно эпителиальными клетками воздухоносных путей и оказывать влияние на гладкие мышцы бронхов [101, 152].

ИЛ-5 – антипараллельный дисульфид-связанный гомодимер. Мономерная форма является биологически неактивной. Множество форм естественного протеина вызваны гетерогенным гликозилированием.

Негликозилированный ИЛ-5 также является биологически активным [128]. Димер имеет структуру с двумя доменами, каждый из которых имеет значительную структурную гомологию с цитокинами GM-CSF, M-CSF, IL2, IL4 и гормонами роста. Структура ИЛ-5 состоит из двух левозакрученных цепей из четырех альфа-спиралей с двумя короткими бета-слоями на противоположных локусах молекулы. С-терминаль нити и спираль одной цепи димера вместе с тремя спиральями и одной нитью конца N-терминали другой цепи соединены в связку из четырех спиралей и бета-слоя. Такая димерная структура ИЛ-5 является уникальной [188]. Мышиный и человеческий ИЛ-5 приблизительно идентичны на 70 %. Генерация похожих человеческого и мышиного протеина показывает, что карбокситерминальный конец белка несет ответственность за его особые свойства. Эта часть, возможно, связывается с рецептором [128].

Мышиный ДНК ИЛ-5 кодирует белок из 113 аминокислот, человеческий протеин состоит из 115 аминокислот.

Ген ИЛ-5 человека имеет длину приблизительно 4 kb и содержит четыре экзона. Ген находится на хромосоме человека 5q23-31 в соседстве с генами, кодирующими гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор, макрофагальный колониестимулирующий фактор, ИЛ-3 и ИЛ-4 [172, 77, 174]. 5' область гена ИЛ-5 содержит некоторые элементы, известные как CLE (conserved lymphokine element), которые являются связывающими для транскрипторных факторов, контролирующих экспрессию этого гена.

Действие ИЛ-5 на клетку (эозинофил) осуществляется через рецепторный комплекс. Рецепторы ИЛ-5 высокой аффинности (приблизительно 30 – 100 на клетку) и низкой аффинности (приблизительно 200 – 400 на клетку) экспрессируются во всех гематopoэтических и лимфоидных клетках. ДНК клонированного мышиного рецептора ИЛ-5 кодирует гликопротеин из 415 аминокислот, включающих секреторную сигнальную последовательность из 17 аминокислот. Внеклеточный домен

этого протеина имеет длину в 322 аминокислоты. Трансмембранный домен имеет длину в 22 аминокислоты и цитоплазматический домен имеет длину в 54 аминокислоты [172].

Рецепторный комплекс представляет собой гетеромер, состоящий из α и β – субъединиц, обе цепочки принадлежат к семейству цитокиновых рецепторов.

Внутриклеточная область альфа-цепи состоит из N-терминальной области около 100 аминокислот с гомологией к похожей последовательности альфа-цепи рецепторов ИЛ-3 и гранулоцитарного макрофагальный колониестимулирующий фактор, следующих за доменами CKR и FNIII, которые содержат последовательность WSXWS. α - субъединица необходима для лиганд – специфического связывания [174].

Ген α – субъединицы достигает 70% гомологии с геном α – субъединицы мыши и 80% - крысы [94]. Ген α -цепи человеческого рецептора ИЛ-5 расположен на хромосоме 3p26 [114, 172].

Существует несколько изоформ α – субъединицы рецептора ИЛ-5, которые включают мембраносвязанную и две растворимые формы (S1 и S2), которые связывают ИЛ-5 с высокой аффинностью [21]. Функция растворимых изоформ мало изучена, но предполагается, что они конкурируют с мембраносвязанной формой за связывание с ИЛ-5 и обладают антагонистическими свойствами, играя регуляторную роль. С другой стороны, возможно, они переносят ИЛ-5 в связанном состоянии [108].

Рецептор содержит также протеин, не связывающий ИЛ-5 - β -субъединицу. Эта вторая субъединица экспрессируется в некоторых ИЛ-3-зависимых клеточных линиях, которые не связывают ИЛ-5 [163]. Вторая субъединица идентична большой субъединице рецептора колониестимулирующего фактора ГМ-КСФ, и рецептора высокой аффинности ИЛ-3 [86, 168].

β – субъединица проводит сигнал внутрь клетки, повышает аффинность связывания [108]. Она заякорена в мембране и не способна связывать ИЛ-5 самостоятельно, но в комплексе с мембраносвязанной изоформой значительно повышается аффинность рецептора к ИЛ-5 и обеспечивает проведение сигнала. β – субъединица не способна связываться с растворимой изоформой α – субъединицы рецептора.

Robb et al вывели трансгенных мышей с несущественными мутациями гена, кодирующего общую β -субъединицу (бета-С) рецепторов гранулоцитарно макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), ИЛ-3 и ИЛ-5 [149]. У гомозиготных развивалась легочная перибронховаскулярная лимфоидная инфильтрация и аналогичный альвеолярный протеиноз. Число эозинофилов в периферической крови и костном мозге у гомозиготных мертвых мутантов было уменьшено, хотя другие гематологические параметры находились в норме. У клеток костного мозга гомозиготных мутантов не было высокоаффинного связывания с ГМ-КСФ, а клетки гетерозиготных животных имели среднее количество высокоаффинных рецепторов. В клонируемых культурах клеток костного мозга, выведенных из гомозиготных мутантов, даже высокие концентрации ГМ-КСФ и ИЛ-5 не стимулировали образование колонии клеток.

Nishinakamura et al скрестили бета-С мутантных мышей с мышами с недостатком ИЛ-3. Дважды-мутированные мыши, обладающие недостаточными функциями ИЛ-3, ГМ-КСФ и ИЛ-5, были, несомненно нормальными и плодоносящими [138]. У животных наблюдалось некоторое уменьшение числа эозинофилов и недостаток эозинофильного ответа на паразитов, как и у бета-С мутантных мышей. Иммунный ответ дважды мутантных мышей на *Listeria* моно-цитогенов был нормальным. Гематопозитическое возвращение в норму после лечения с *Fluorouracil* было также нормальным. Эти результаты подтверждают наличие альтернативных механизмов в образовании кровяных клеток, не зависящих от присутствия ИЛ-3, ГМ-КСФ и ИЛ-5.

Все вышесказанное делает ИЛ-5 заманчивой терапевтической мишенью для селективного уменьшения тканевого повреждения, сопровождающего аллергическое воспаление, при этом можно избежать иммуносупрессивных последствий, связанных с регулярным применением плейотропных препаратов, таких как стероиды. Чтобы предотвратить возникновение токсических и провоспалительных эффектов, возникающих в результате дегрануляции эозинофилов, необходимо блокировать действие ИЛ-5 на эти клетки, то есть блокировать взаимодействие между ИЛ-5 и рецептором к нему. Одним из путей предотвращения связывания ИЛ-5 с его рецептором является применение моноклональных антител (TRFK-5) к ИЛ-5. Эффективность применения моноклональных антител была продемонстрирована в экспериментах на обезьянах [189], морских свинках и мышцах [89]. Анти-ИЛ-5 терапия приводит к редукции эозинофильного воспаления, восстанавливает функцию M_2 -мускариновых рецепторов, снижает гиперреактивность дыхательных путей при астме и улучшает функцию легких [90]. Однако в исследованиях на морских свинках с экспериментальной бронхиальной астмой было замечено, что для блокирования гиперреактивности дыхательных путей необходимы более высокие дозы препаратов моноклональных антител к ИЛ-5, чем для блокирования эозинофильного воспаления [89, 98]. Хотя существуют исследования, в которых показано ингибирование с помощью антител к ИЛ-5 эозинофильного воспаления, но при этом сохранение гиперреактивности воздухоносных путей [142]. Поэтому нужны новые пути для предотвращения связывания ИЛ-5 с ИЛ-5-рецептором на клетках-эффекторах при бронхиальной астме.

Еще одним возможным способом предотвращения связывания ИЛ-5 с его рецептором является блокирование рецептора на клетках-эффекторах, и как следствие, нарушение сигнальной трансдукции клетки. Блокирование передачи сигнала внутрь клетки представляется более трудным. Более простым и перспективным подходом является связывание внеклеточного

ИЛ-5, и последующая его элиминация. Связывание ИЛ-5 можно осуществить, используя растворимую изоформу α – рецептора к ИЛ-5. Используя методы молекулярной биологии и генной инженерии, возможно создание клона клеток, активно продуцирующих растворимую форму ИЛ-5-рецептора, которая будет эффективно связываться с ИЛ-5 и в виде комплекса элиминироваться из организма. В дальнейшем возможна разработка перспективной генноклеточной терапии бронхиальной астмы.

ГЛАВА II

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В работе использовались экспериментальные животные – половозрелые морские свинки-самцы весом 200-400 г в количестве 67 особей, из которых на 37 моделировалась гиперреактивность воздухоносных путей, а 30 - служили контролем.

Моделирование гиперреактивности воздухоносных путей у животных проводилось по методике, предложенной Каллосом и Пэйджлом [47]. Данная модель была выбрана нами, поскольку, по многочисленным литературным данным, она в наибольшей степени соответствует поставленным задачам. Описаны результаты исследования на данной модели морфологических [134, 154, 186], биохимических [27, 62] и иммунологических [100, 125, 140] изменений.

Схема построения эксперимента представлена на рисунке 1. Животные экспериментальной группы сенсibilизировались трехкратно подкожными инъекциями 0,1 мл на 100 г. массы тела животного 0,25% раствора овальбумина в физиологическом растворе (промежуток между инъекциями 3-4 дня). На 21 день животные подвергались ингаляционному воздействию аэрозоля того же раствора (рис. 1). Ингаляции выполнялись с помощью ультразвукового небулайзера (использует энергию колебаний пьезокристалла) «Муссон-1М» (изготовитель: Россия, г. Барнаул, ОАО Алтайский приборостроительный завод «Ротор»), размер дисперсных частиц до 5 мкм. Такие размеры частиц являются оптимальными и не задерживаются в верхних дыхательных путях, проникая в дистальные бронхи.

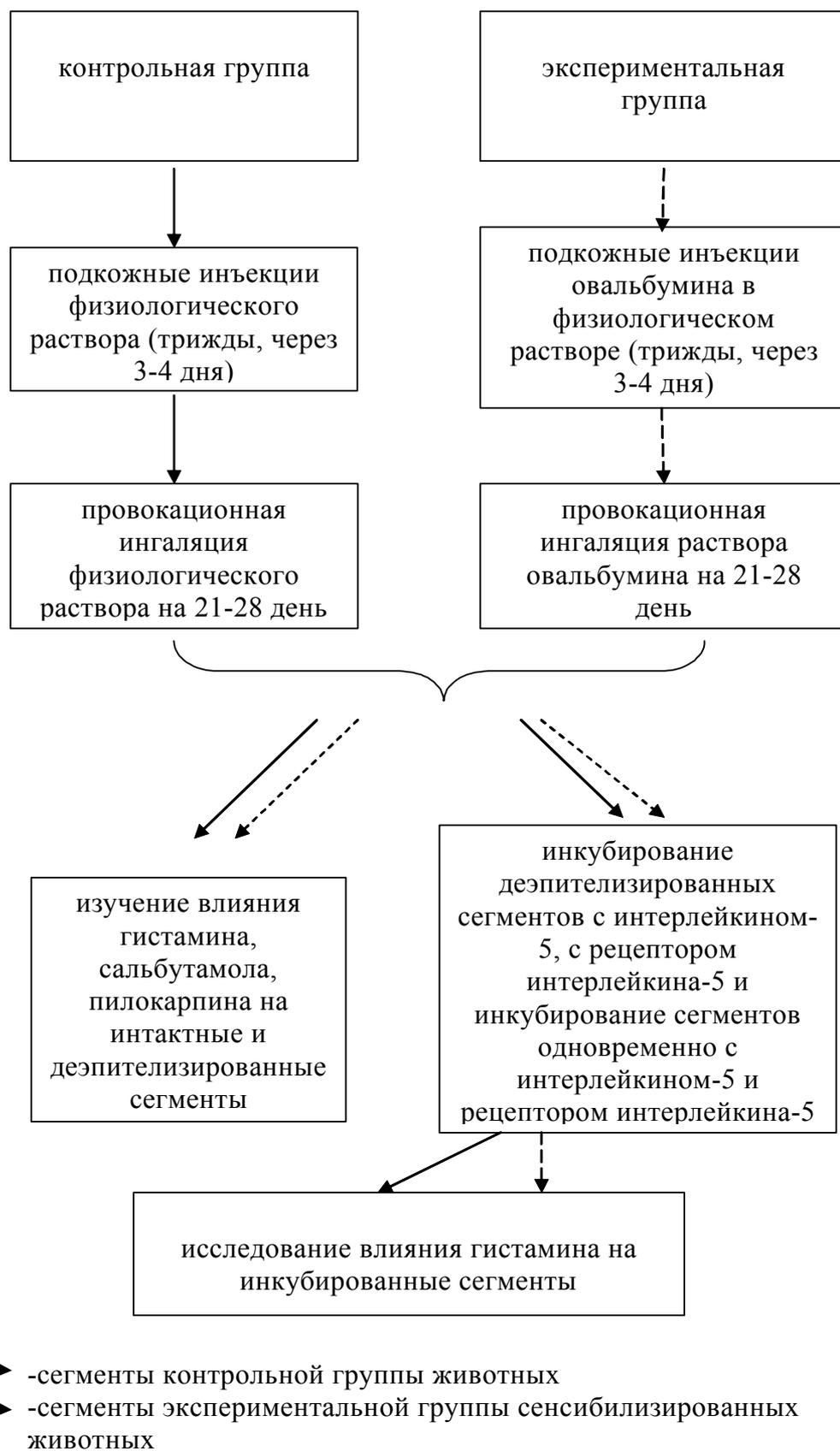


Рис. 1 Дизайн эксперимента.

Животные контрольной группы (интактные) подвергались воздействию по аналогичной схеме, только вместо раствора овальбумина для инъекций и ингаляции использовался физиологический раствор.

После окончания ингаляции животных умерщвляли без применения наркоза методом цервикальной дислокации, вскрывали грудную клетку, выделяли легкие. Главные бронхи отпрепаровывались от окружающей ткани в ванночке с раствором Кребса при комнатной температуре (20 - 25 °С). Для изучения сократительной активности приготавливались кольцевые сегменты длиной 2-3 мм. При необходимости эпителий удалялся механически, вращением деревянного шпателя в просвете сегмента в течение 1 мин [76].

Для изучения влияния интерлейкина 5 и рецептора интерлейкина 5 деэпителизированные сегменты инкубировались в течение 18 часов в термостате при температуре 25⁰С в среде RPMI-1640 с добавлением интерлейкина в концентрации 0,1 мкг/мл и/или с добавлением α -субъединицы рецептора интерлейкина 5 в концентрациях 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл.

2.2. Методика исследования

Метод механографии

Механическое напряжение гладкомышечных сегментов изучалось с помощью метода механографии в условиях, близких к изометрическим. Установка, с помощью которой исследовалась сократительная активность, изготовлена на опытно - экспериментальном производстве СФТИ и в СКБ при СГМУ по специальному заказу. В ее состав входит станина с теплообменником, в крышке которого размещена кювета объемом 5 мл. В дне кюветы закреплены металлические крючки. Препараты закрепляются на крючках в кювете, после растяжения нагрузкой 500 мг они фиксируются на

штоке механоэлектрического преобразователя. Блок-схема установки представлена на рис.2.

Сегменты в кювете находятся в аэрируемом растворе Кребса постоянной температуры 37°C. Каждые 15 мин во время отмывания производится смена раствора, по времени занимающая 1 - 2 секунды. В качестве механоэлектрического преобразователя использован ламповый механотрон 6МХ2Б (производство 2-го Московского электролампового завода). В механотроне два анода: фиксированный и подвижный. Ток, протекающий через подвижный анод, зависит от величины его смещения. Смещение подвижного анода зависит от силы, развиваемой ГМК. На усилитель с симметричным входом подается разница напряжений на фиксированном и подвижном анодах механотрона. С усилителя, собранного на базе микросхем К140УД8А, сигнал выводится на самопишущий прибор типа «Recorder».

Перед началом исследования сегменты тестировались воздействием гиперкалиевого раствора Кребса (40 мМ), амплитуда ответа на который принималась за 100%. Величины сократительных ответов на тестирующие растворы оценивались в % от амплитуды этого контрольного сокращения. По результатам тестирования строились кривые “доза-эффект”. Вклад эпителия определялся путем сопоставления сократительных реакции интактных и деэпителизированных сегментов бронхов.

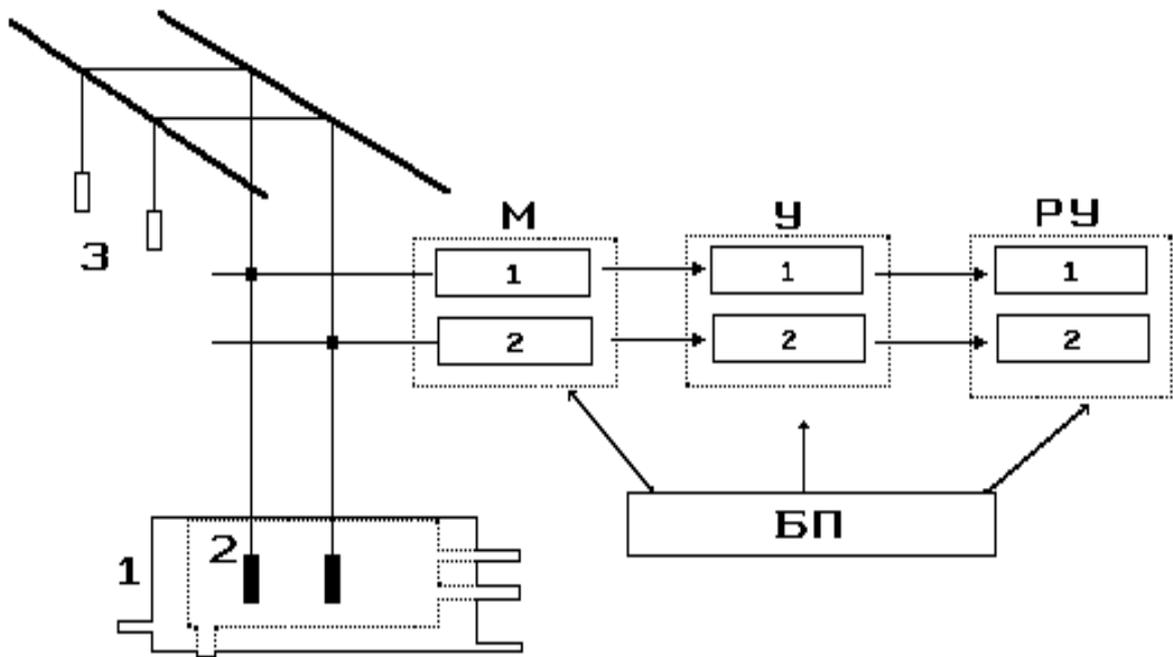


Рис. 2. Блок-схема 2-канальной механографической установки.
Обозначения:

М - механотроны, У - усилители, РУ - регистраторы, БП - блок питания. 1 - термостатируемая кювета, 2 - гладкомышечные сегменты на крючках, 3 – нагрузка, соединенная нитью с подвижным крючком и штоком механотрона.

Растворы и реактивы

Все растворы готовились на основе дистиллированной воды, удельное сопротивление которой было не менее 4 МОм*см.

1. Нормальный раствор Кребса (мМ):

NaCl - 120,4;

KCl - 5,9;

MgCl₂ - 1,2;

CaCl₂ - 2,5;

глюкоза - 11,5;

NaH₂PO₄ - 1,2;

трис(оксиметил)-аминометан - 15,5.

2. “Гиперкалиевый” раствор Кребса:

На основе нормального раствора Кребса готовили «гиперкалиевые» растворы эквимольным замещением ионов натрия ионами калия в концентрациях 20, 40, 60, 80, 100 и 120 мМ.

рН растворов поддерживался в пределах 7,35 - 7,40, температура 37 °С. Растворы аэрировались воздухом. Все соли для приготовления раствора Кребса - ХЧ (Реахим, РФ).

Используемые реактивы: пилокарпин (0,01 нМ –100 мкМ), гистамин (0,01 нМ –100 мкМ), сальбутамол (0,01 нМ –10 мкМ) (все производства России), овальбумин (egg white) (ICN Biomedicals, Inc., США), рекомбинантный человеческий интерлейкин 5 (Biosource International, Inc., США), рецептор интерлейкина 5 (R&D Systems Inc., США).

Методика модельного расчета кинетических характеристик

Нелинейное оценивание изменений механического напряжения гладкомышечных сегментов проводилось с помощью программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft методом Rosenbrock and quasi-Newton.

Зависимость между величиной сократительных реакций и концентрацией медиатора выражалась уравнением Кларка [79]:

$$E = \frac{E_{\max} * c}{c + K}, \text{ где}$$

E – эффект медиатора, вызванный концентрацией c (амплитуда реакции),

E_{\max} – максимальный ответ,

c – концентрация медиатора, вызывающая ответный эффект E ,

K – константа сродства лиганд-рецепторного комплекса, отражающая степень сродства рецептора к медиатору.

Достоверность соответствия экспериментальных данных уравнению выражается величиной R (R -квадрат ($0 < R\text{-квадрат} < 1$, так называемый квадрат смешанной корреляции (*коэффициент определенности- coefficient of determination* в англоязычной литературе)). При этом соответствие считается достоверным, если $R > 0,99$.

Морфологические исследования

От каждого животного для гистоморфологического исследования забирался гистологический материал главных бронхов, среднедолевых бронхов и мелких бронхиол с участками легочной паренхимы. Забранный материал фиксировался в 10-12% нейтральном растворе формалина при 18-20 °С в течение 24-48 часов, промывался в проточной воде в течение 24 часов, обезвоживался в спиртах возрастающей концентрации (50%, 60%, 70%, 80%, 96%, абс I, абс II). Затем заливался в парафин.

Для осуществления обзорной микроскопии слизистой оболочки бронхов проводилась окраска микропрепаратов гематоксилином и эозином [13, 29]. Принцип метода заключается в том, что ядра клеток обладают сродством к основному красителю гематоксилину, а цитоплазма к кислому красителю эозину.

Для исследования коллагеновых волокон соединительной ткани срезы окрашивались пикрофуксином по Ван-Гизону [38]. Принцип метода заключается в том, что коллагеновые волокна воспринимают пикрофуксин и окрашиваются в ярко розовый цвет, а ядра клеток в черный цвет.

Исследование морфологии тканевых базофилов и ЭФ производилось с помощью сочетанной окраски гистологических препаратов основным коричневым и прочным зеленым [22]. Принцип метода заключается в том, что в основной среде (pH=8,7) катионные белки эозинофилов способны образовывать стойкие соединения с прочным зеленым, окрашиваясь в темно-зеленый цвет, а гранулы тучных клеток с основным коричневым с формированием темно-желтых гранул.

Микрофотографирование препаратов осуществляли цифровым фотоаппаратом (LDC Digital camera QV-100 фирмы Casio).

2.3. Статистическая обработка результатов

Анализ данных проводился при помощи программы Statistica 6.0 for Windows фирмы Statsoft. Фактические данные представлены в виде «среднее \pm ошибка среднего» ($X \pm m$).

Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова, а также визуальную проверку методом гистограмм .

Сформированные выборки не подчинялись нормальному распределению и, следовательно, применение параметрических статистических критериев,

построенных на основании параметров совокупностей, распределяемых по нормальному закону, являлось недопустимым.

Непараметрические статистические критерии, представляющие собой функции, зависящие непосредственно от вариант данной совокупности с их частотами используют для проверки гипотез независимо от формы распределения совокупностей, из которых взяты сравниваемые выборки. Если функция распределения не является нормальной, непараметрические критерии оказываются более мощными, чем параметрические [23].

Гипотезу о принадлежности сравниваемых независимых выборок к одной и той же генеральной совокупности или к совокупностям с одинаковыми параметрами проверяли с помощью рангового *U* - критерия Манна-Уитни. В данном исследовании этот метод использовался для определения межгрупповых различий при сравнении групп интактных животных и животных с моделью бронхиальной астмы; сегментов, инкубированных с интерлейкином 5 и неинкубированных; сегментов, инкубированных с рецептором интерлейкина 5 и неинкубированных; сегментов, инкубированных с интерлейкином 5, и сегментов, инкубированных с рецептором интерлейкина 5; сегментов, инкубированных с интерлейкином 5, и сегментов, инкубированных одновременно с интерлейкином 5 и рецептором интерлейкина 5.

Когда члены сравниваемых выборок были связаны попарно (зависимые выборки), различия между ними оценивали с помощью рангового *T*-критерия Вилкоксона. Применение этого метода было необходимо для сравнения амплитуд сократительных и дилатационных реакций с базальным тонусом и амплитудой предсокращения.

ГЛАВА III

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Морфологические изменения в стенке воздухоносных путей морских свинок при формировании гиперреактивности бронхов

В данном разделе работы представлены результаты морфогистологического исследования сегментов главного, среднедолевого бронха и мелких бронхов. Эти исследования выполнялись с целью выявления морфологических изменений стенки воздухоносных путей морских свинок при формировании гиперреактивности.

На гистологических препаратах определялась слизистая, собственная пластинка слизистой, волокнисто-хрящевая оболочка. В слизистой оболочке эпителиальный пласт сохраняет свою целостность. Среди эпителиоцитов идентифицировались реснитчатые, бокаловидные и резервные клетки. Среди эпителиальных клеток преобладали эпителиоциты с признаками дистрофии (у них отсутствовали реснички на апикальной стороне, грубая зернистость в цитоплазме, глыбчатость хроматина, пикноз ядра (рис. 3). Базальная мембрана извита и местами утолщена (косвенное свидетельство отложения в ней иммунных комплексов).

В собственной пластинке слизистой оболочки мощный отек, скопление отечной жидкости отмечается под базальной мембраной и периваскулярно (рис. 4). Полнокровие сосудов отмечается на всем протяжении собственной пластинки слизистой оболочки, эндотелиальные клетки в капиллярах набухшие, отмечается стаз полиморфноядерных лейкоцитов внутри сосудов (среди лейкоцитов определялись и эозинофилы). Венозная гиперемия, мышечная стенка в некоторых венах гипертрофированна, что свидетельствует о хроническом застойном процессе в бронхах. В клеточном инфильтрате пластинки слизистой оболочки определялись

дегранулированные эозинофилы и тучные клетки, которые локализовались, преимущественно, под базальной мембраной. Зоны локализации клеточного инфильтрата сочетались с эксфолиацией бронхиального эпителия в просвет бронха. Мышечные волокна собственной пластинки слизистой оболочки гипертрофированны.

В целом, гистологическая картина бронхов у морских свинок после сенсibilизации овальбумином во многом сходна с таковой у больных atopической бронхиальной астмой [16, 37]. Полученные данные позволяют провести определенные параллели между гиперреактивностью воздухоносных путей морских свинок при сенсibilизации овальбумином и гиперреактивностью бронхов у больных бронхиальной астмой. Это дает основание рассматривать полученные далее результаты и в аспекте анализа механизмов патогенеза данного заболевания.

3.2. Особенности сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей в условиях формирования гиперреактивности

В данном разделе диссертации представлены результаты исследования влияния гистамина, агониста H-рецепторов, сальбутамола, агониста β_2 -адренорецепторов и пилокарпина, агониста $M_{2,3}$ -холинорецепторов, на сегменты бронхов морских свинок контрольной группы и экспериментальной. Данные исследования проводились с целью выявления различий в ответных реакциях на влияние агонистов между сегментами двух групп и определения роли эпителия в данных реакциях.

В предварительной серии экспериментов была определена концентрация предсокращающего гиперкалиевого раствора Кребса, вызывающего полумаксимальное сокращение сегментов бронхов. Она оказалась равна 40 мМ KCl.

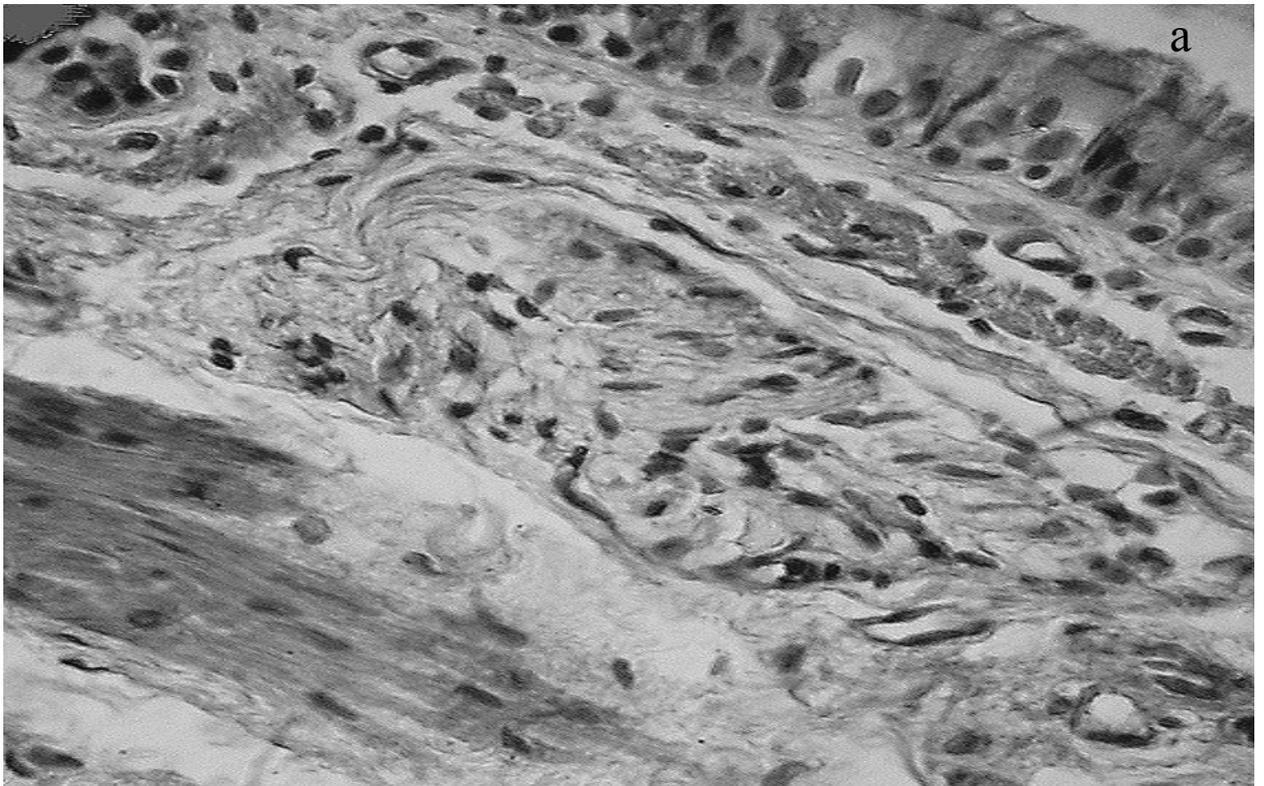


Рис. 3. Биоптат среднедолевого бронха у морской свинки при моделировании астматического приступа. Бронхиальный эпителий с признаками дистрофии (а). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону. Ув. 400



Рис. 4. Биоптат среднедолевого бронха у морской свинки при моделировании астматического приступа. Скопление отечной жидкости под базальной мембраной (а) и периваскулярно (б). Окраска пикрофуксином по Ван-гизону. Ув. 400.

Выбор предсокращающего фактора был обусловлен тем, что механизм калиевой контрактуры связывают только с потенциалзависимым входом ионов Ca^{2+} , при этом в процесс не вовлекаются никакие другие сигнальные пути [56, 59].

3.2.1. Исследование особенностей гистаминергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях формирования гиперреактивности

В первой серии экспериментов изучалось влияние гистамина в концентрациях 0,1 нМ – 100 мкМ на сократительную активность интактных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы.

Все сегменты отвечали на воздействие гистамина в концентрациях 0,01 мкМ – 100 мкМ дозозависимым сокращением (рис. 5). Максимальная амплитуда сокращения сегментов на гистамин в концентрации 100 мкМ составила $40,96 \pm 2,44$ % ($n=15$).

Фармакологическое действие гистамина реализуется через рецепторный аппарат. Гистамин вызывает сокращение ГМ, взаимодействуя со специфическими гистаминовыми рецепторами сарколеммы, происходит инициация рецептор управляемого входа Ca^{2+} в ГМК, освобождается Ca^{2+} из внутриклеточных депо и активируется фосфолипаза С [56, 72].

При исследовании влияния гистамина на сократительную активность деэпителизированных сегментов контрольной группы было обнаружено, что сегменты отвечают дозозависимым сокращением на концентрации 0,01 мкМ – 100 мкМ (рис. 5). Максимальная амплитуда реакций на концентрацию гистамина 100 мкМ была выше амплитуды интактных сегментов и составила $53,65 \pm 1,82$ % ($p < 0,05$, $n=9$).

В интактных сегментах при действии гистамина эпителий может вырабатывать релаксирующие факторы, такие как, например, оксид азота, и

тем самым уменьшать амплитуду контрактивных реакций. У человека с NO связано, в частности, расширение бронхов без участия адренергических или холинергических рецепторов, блокирование вызываемого гистамином бронхоспазма [91]. Поэтому при удалении эпителия амплитуда сокращения гладких мышц повышается.

В следующей серии экспериментов изучались сократительные реакции интактных сегментов сенсibilизированных морских свинок на воздействие гистамина.

Все исследуемые сегменты отвечали сокращением на воздействие гистамина в концентрациях 0,1 нМ – 100 мкМ (рис. 6), максимальная амплитуда сокращения составила $73,36 \pm 5,32$ % (n=13). При этом на концентрации гистамина 10 и 100 мкМ, амплитуда сокращения сегментов экспериментальной группы была достоверно выше ($p < 0,05$) амплитуды сокращения сегментов контрольной группы (рис. 6).

В условиях сенсibilизации овалбумином в бронхах повышена экспрессия рецепторов гистамина первого типа [148]. Возрастание максимальной амплитуды сокращения сегментов сенсibilизированных животных может свидетельствовать об увеличении количества рецепторов к гистамину в мембране. Этим можно объяснить более выраженный сократительный эффект гистамина на гладкие мышцы бронхов, полученных от животных экспериментальной группы.

При исследовании гистаминергических сократительных реакций гладких мышц дезэпителизированных сегментов воздухоносных путей сенсibilизированных морских свинок было выявлено, что гладкие мышцы отвечают дозозависимым сокращением на воздействие гистамина в концентрациях 0,1 нМ – 100 мкМ (рис. 7). Максимальная амплитуда сокращения сегментов составила $89,74 \pm 6,49$ % (n=18).

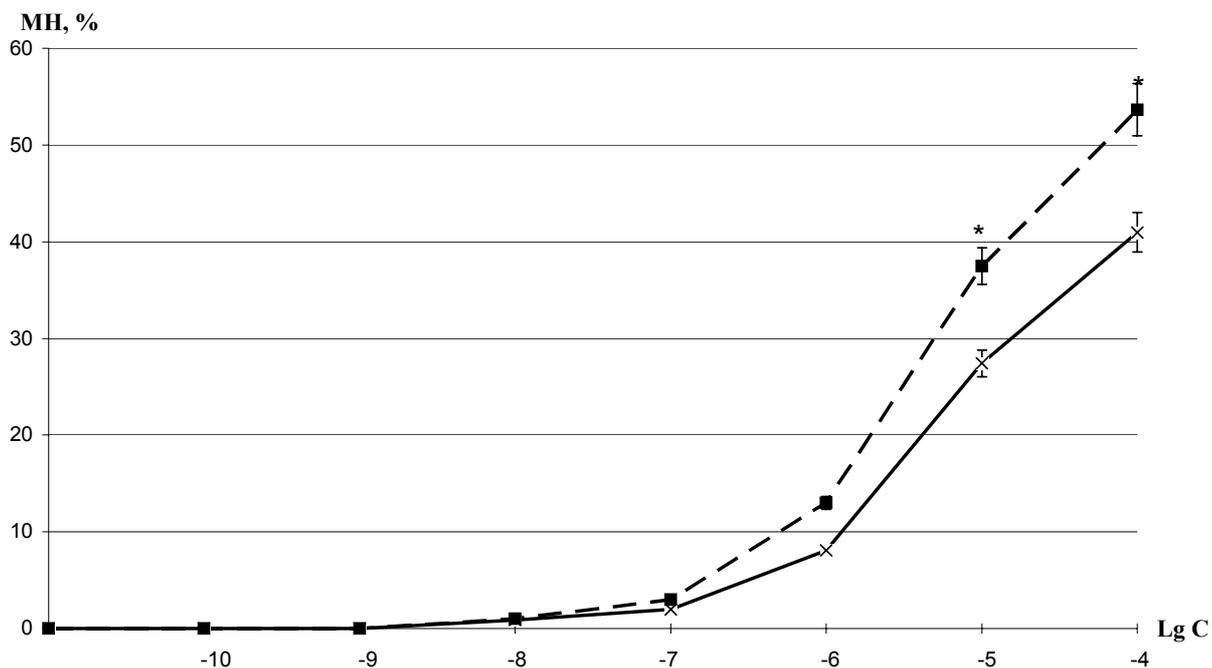


Рис. 5. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы от концентрации гистамина.

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием.

Пунктирная линия – сегменты без эпителия.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов с сохраненным эпителием и без эпителия.

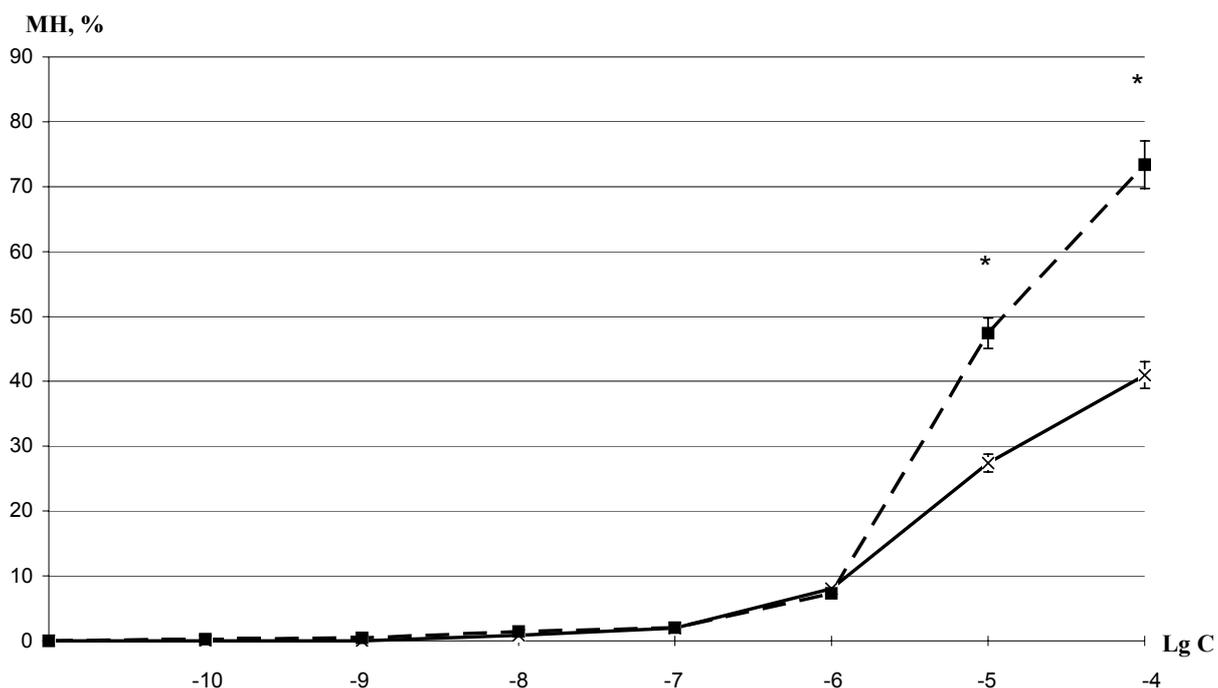


Рис. 6. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина (эпителий сохранен).

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов морских свинок контрольной группы и сенсibilизированных.

Амплитуда сокращения деэпителизированных сегментов экспериментальной группы была несколько выше амплитуды сокращения интактных сегментов (рис. 7), но это различие не было достоверным. Вероятно, это связано с тем, что при сенсibilизации морских свинок овалбумином эпителий повреждается в первую очередь и снижается продукция релаксирующих факторов [75, 189]. Некоторые исследователи полагают, что гиперреактивность бронхов вирусной и аллергической этиологии коррелирует с недостаточностью конститутивной NO-синтазы и может быть устранена низкими дозами L-аргинина [137, 160]. Тем более, что у морских свинок именно легкие являются шоковым органом анафилаксии [17].

Таким образом, различия в величине амплитуды гистаминергических сократительных реакций интактных и деэпителизированных сегментов воздухоносных путей морских свинок в условиях сенсibilизации отсутствуют. При этом амплитуда сокращения сегментов без эпителия, выделенных от сенсibilизированных животных, была достоверно выше амплитуды сокращения деэпителизированных сегментов контрольной группы на концентрации гистамина 10 мкМ ($p < 0,05$) и 100 мкМ ($p < 0,05$) (рис. 8). Этот факт также может объясняться увеличением количества рецепторов к гистамину в мембране ГМ воздухоносных путей в условиях сенсibilизации [148].

Подобная картина была получена нами и в следующей серии экспериментов, при исследовании влияния гистамина на сегменты, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса.

При воздействии гистамина в концентрациях 0,01 нМ – 100 мкМ на интактные сегменты контрольной группы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса (рис. 9), величина механического напряжения последних достоверно не изменялась ($n=11$).

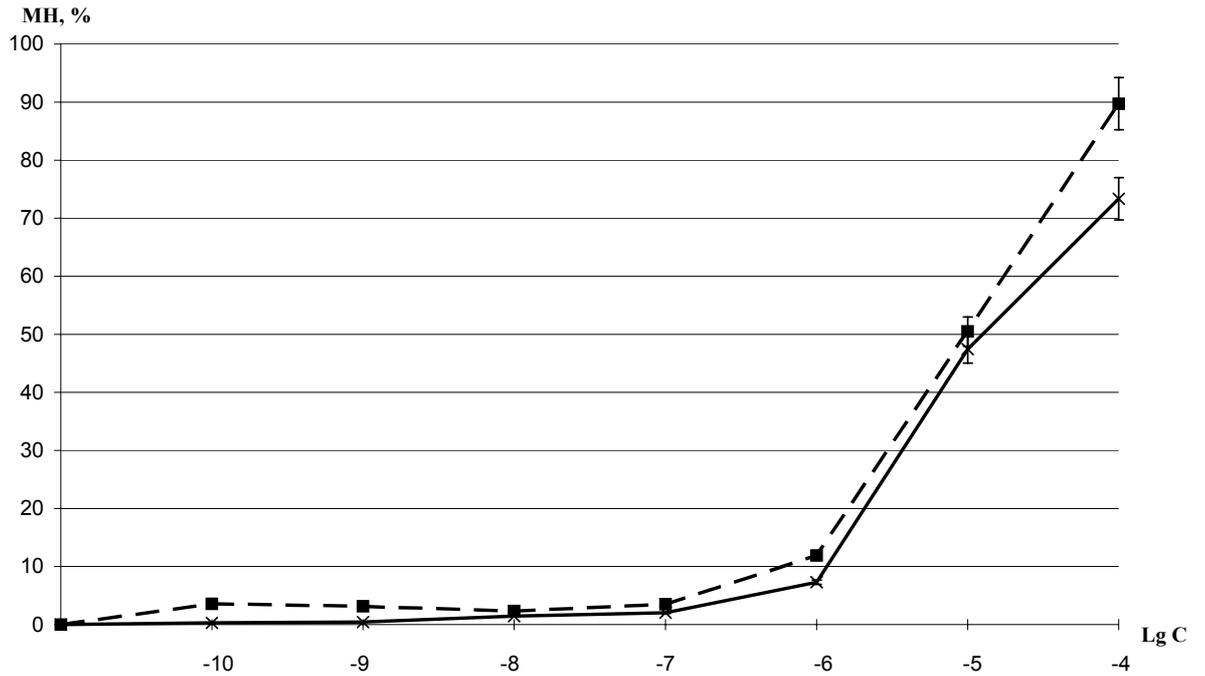


Рис. 7. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов сенсibilизированных морских свинок от концентрации гистамина.

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием.

Пунктирная линия – сегменты без эпителия.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

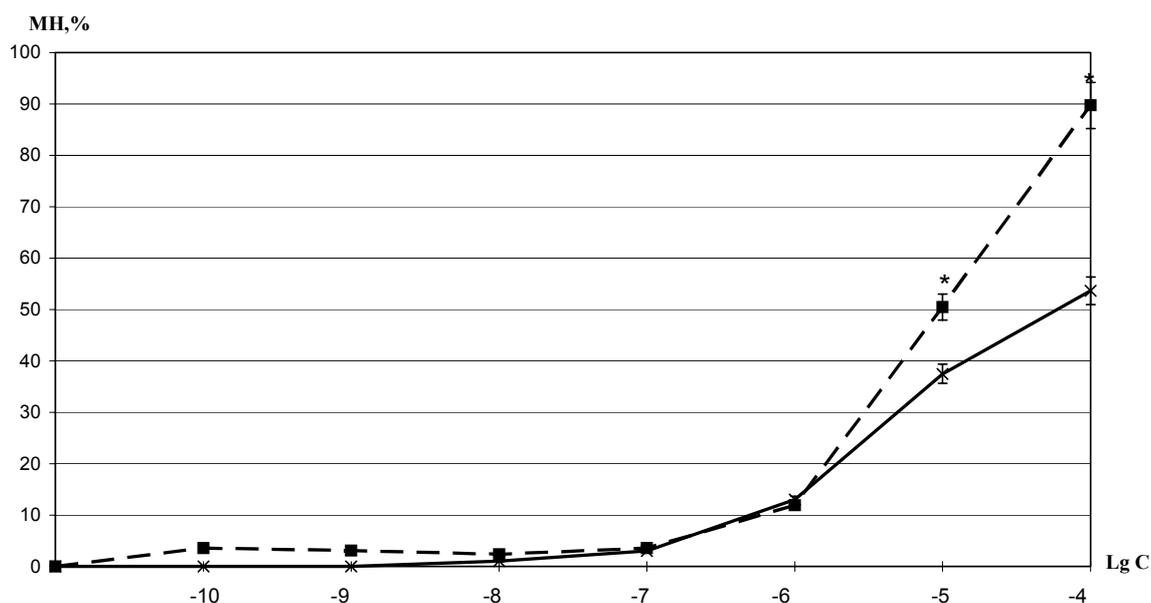


Рис. 8. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина (эпителий удалён).

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты sensibilizированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов морских свинок контрольной группой и sensibilizированных.

После удаления эпителия у сегментов контрольной группы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, наблюдался дозозависимый прирост механического напряжения на воздействие гистамина в концентрациях 10 нМ – 100 мкМ (рис. 9), максимальная амплитуда сокращения дезэпителизированных сегментов составила $121,3 \pm 3,36$ % (n=10).

При сравнении амплитуды сократительных реакций интактных и дезэпителизированных сегментов морских свинок контрольной группы отмечается повышение реактивности после удалении эпителия на концентрации гистамина 1 нМ (p<0,05), 10 нМ (p<0,01), 100 нМ (p<0,01), 1 мкМ (p<0,01), 10 мкМ (p<0,01), 100 мкМ (p<0,01).

Полученные результаты по-видимому, связаны со способностью эпителия продуцировать релаксирующие факторы, которые нивелируют сократительные эффекты гистамина.

При исследовании гистаминергических реакций интактных сегментов сенсibilизированных морских свинок, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса (рис. 10), наблюдался дозозависимый прирост механического напряжения при воздействии гистамина в концентрации 0,01 нМ – 100 мкМ (n=7).

При сохраненном эпителии обнаруживалась достоверная разница в амплитудах сократительных реакция между сегментами животных контрольной группы и сегментами сенсibilизированных животных (рис. 10) на концентрации гистамина 100 мкМ (p<0,01), 10 мкМ (p<0,01), 1 мкМ (p<0,01), 0,1 мкМ (p<0,01), 0,01 мкМ (p<0,01) и 1 нМ (p<0,01). Это может быть связано с повреждением эпителия при сенсibilизации и неспособностью его выполнять свои функции в полном объеме [75, 189].

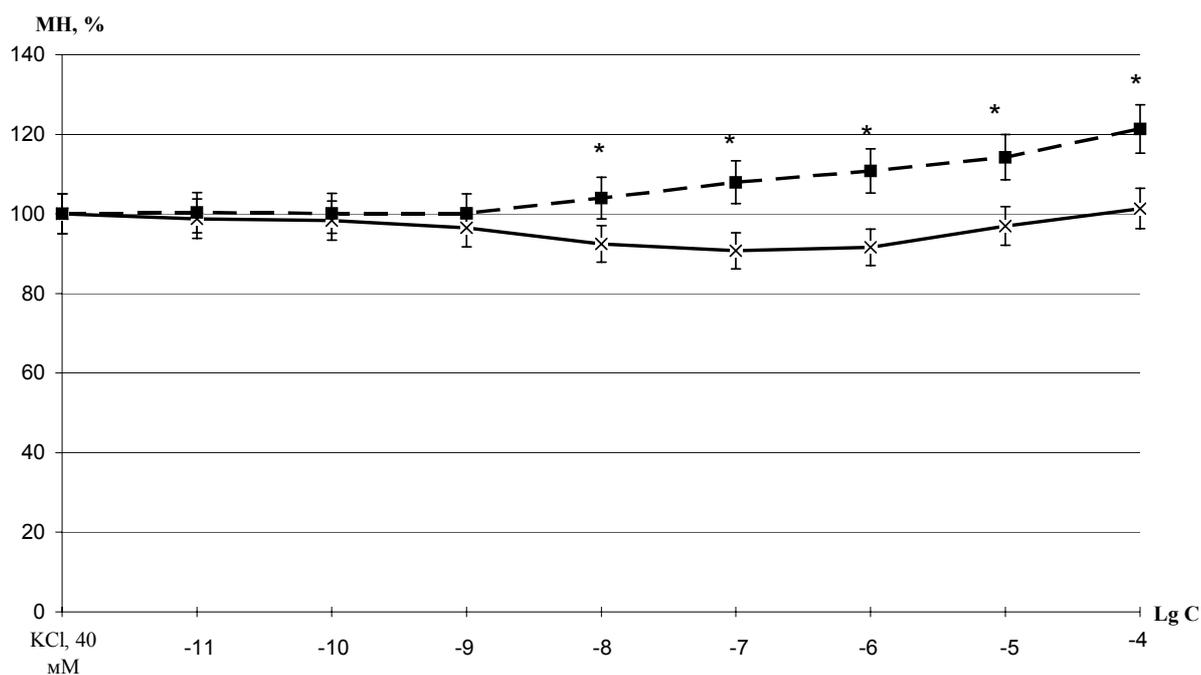


Рис. 9. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы от концентрации гистамина.

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием.

Пунктирная линия – сегменты без эпителия.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов с сохраненным эпителием и без эпителия.

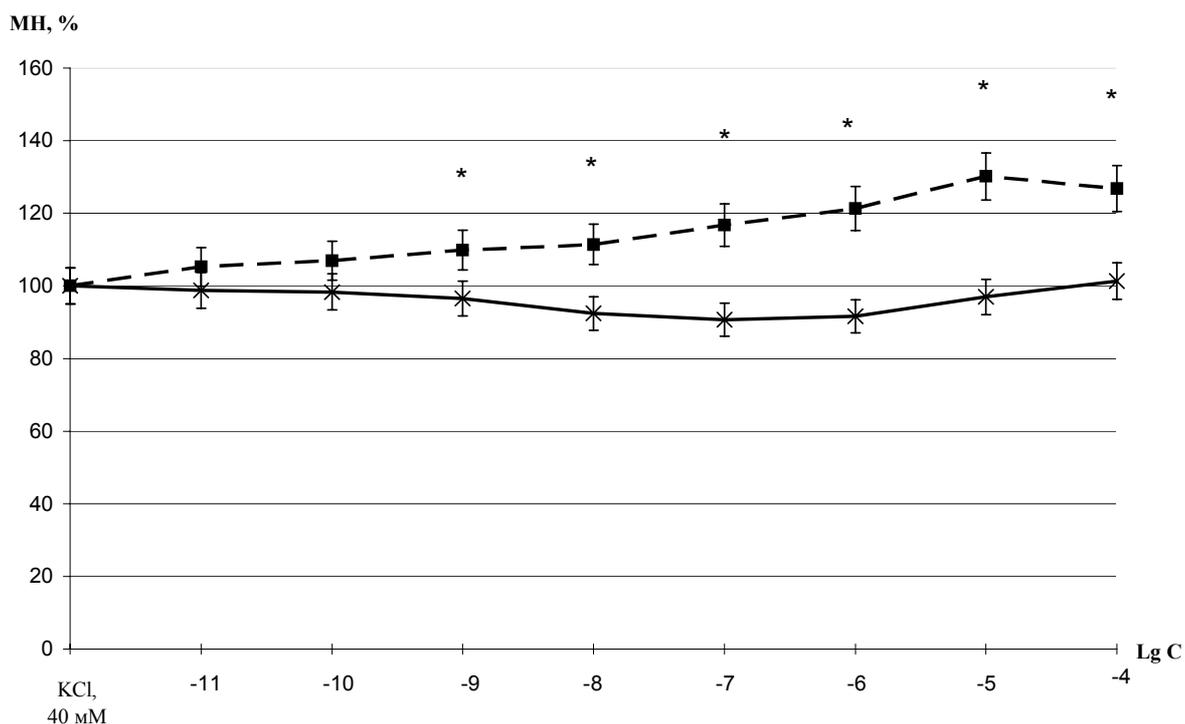


Рис. 10. Зависимость механического напряжения (МН) интактных (с эпителием) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина.

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сегментов морских свинок контрольной группы и сенсibilизированных.

При изучении гистаминергических реакций деэпителизированных сегментов сенсibilизированных морских свинок, наблюдалось дозозависимое сокращение (рис. 11) на воздействие 0,01 нМ – 100 мкМ гистамина (n=10). Достоверной разницы в амплитудах сократительных реакций между интактными и деэпителизированными сегментами, предсокращенными гиперкалиевым раствором Кребса, обнаружено не было (рис. 11). Эти результаты также свидетельствуют в пользу приводимой выше гипотезы о повреждении эпителия.

При этом амплитуда сократительных реакций сегментов сенсibilизированных морских свинок была достоверно выше, чем амплитуда сокращения сегментов свинок контрольной группы на концентрации гистамина: 100 мкМ ($p < 0,05$), 10 мкМ ($p < 0,05$), 1 мкМ ($p < 0,05$). Максимальная амплитуда сегментов экспериментальной группы была на 25,7 % выше, чем у сегментов контрольной группы (рис. 12).

Увеличение механического напряжения сегментов воздухоносных путей, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, на гистаминергические воздействия при сенсibilизации также могут объясняться увеличением количества рецепторов к гистамину на ГМК [148].

В основе острых аллергических реакций, например, бронхоспазма, лежит гиперчувствительность немедленного типа. Ее опосредуют молекулы, которые высвобождаются тучными клетками при взаимодействии аллергена с IgE на поверхности клеток: гистамин, триптаза и мембранные липидные медиаторы [54]. В малых концентрациях гистамин взаимодействует с гистаминовыми рецепторами тучных клеток и способствует квантованному выделению этими клетками гистамина в высоких концентрациях, достаточных для вызова тонического сокращения ГМК воздухоносных путей [20].

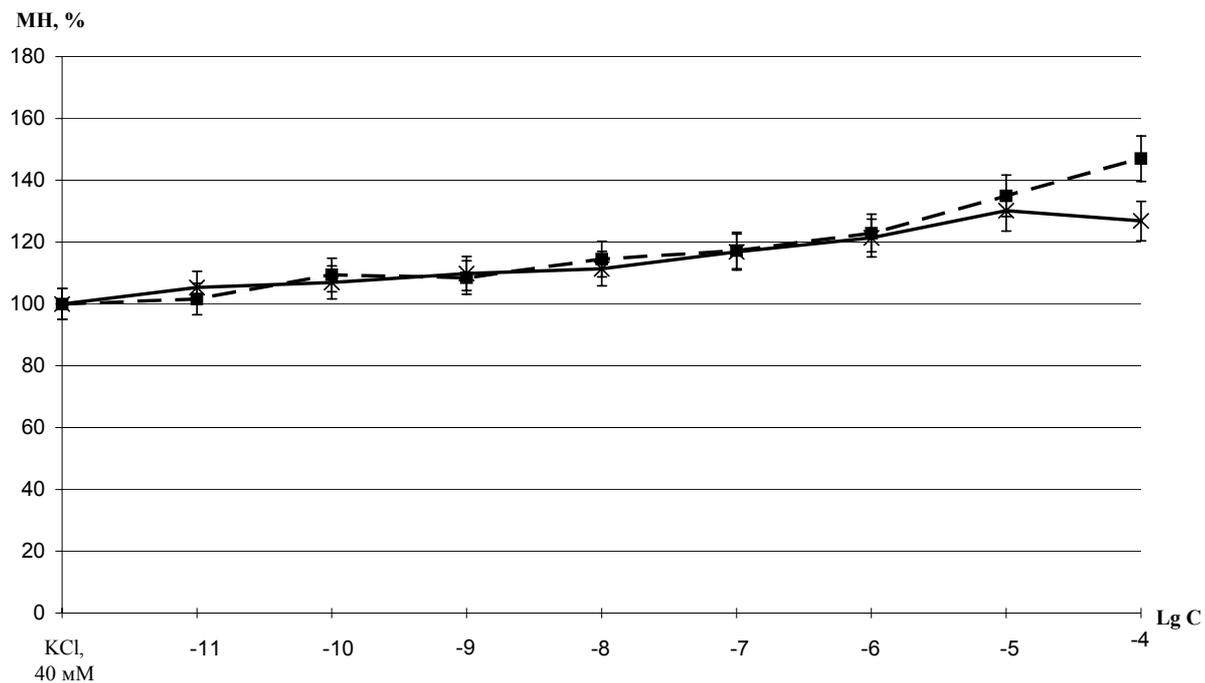


Рис. 11. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов сенсibilизированных морских свинок, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации гистамина.

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием.

Пунктирная линия – сегменты без эпителия.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

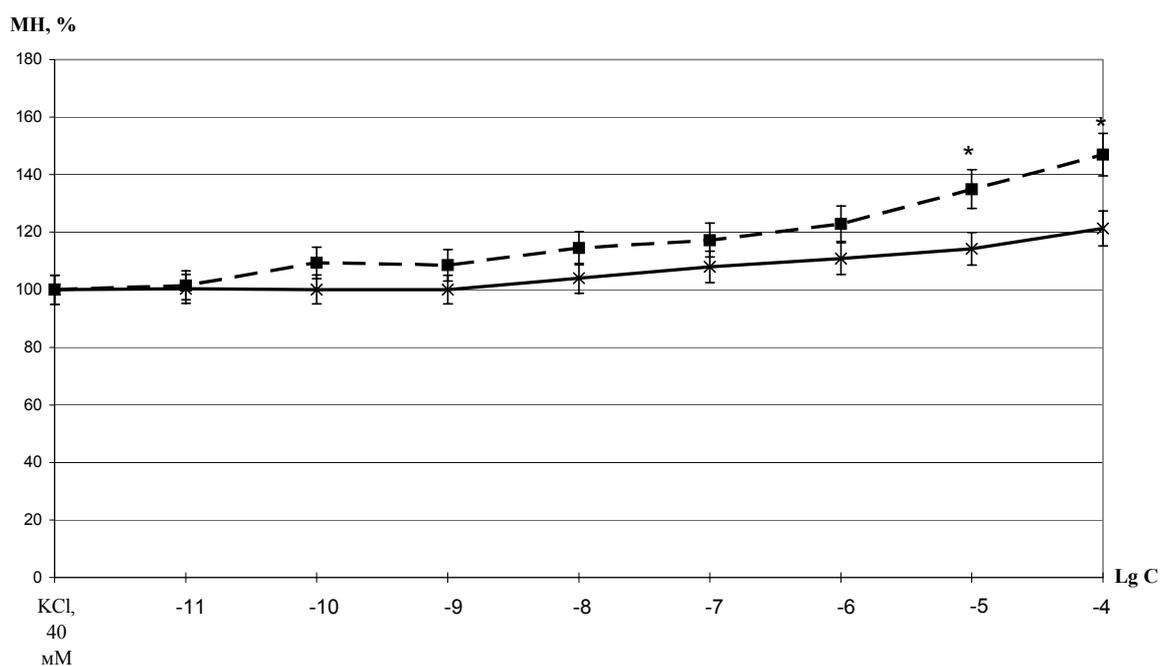


Рис. 12. Зависимость механического напряжения (МН) деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации гистамина.

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов морских свинок контрольной группы и сенсibilизированных.

Фармакологическое действие гистамина реализуется через рецепторный аппарат и связано со спазмом гладкой мускулатуры бронхов, кишечника, спазмом сосудов малого круга кровообращения и т.д. Гистамин взаимодействует со специфическими гистаминовыми рецепторами сарколеммы, ионы Ca^{2+} входят в ГМК и освобождаются из внутриклеточных депо, происходит активация фосфолипазы C, развивается сокращение ГМ [20]. При БА в бронхах повышена экспрессия рецепторов гистамина первого типа. Возрастание максимальной амплитуды сокращения сегментов сенсibilизированных животных может свидетельствовать об увеличении количества рецепторов к гистамину в них [148]. Это может объяснить более выраженный эффект действия гистамина на гладкие мышцы бронхов, полученных от животных экспериментальной группы.

В норме тонус гладкой мускулатуры бронхов в основном определяется динамическим дисбалансом образующегося в эпителии оксида азота и секретируемого тучными клетками гистамина, то есть при действии гистамина эпителий может вырабатывать релаксирующие факторы, такие как оксид азота, и тем самым уменьшать амплитуду контрактильных реакций [91]. При сенсibilизации происходит нарушение целостности эпителиального пласта, возникают необратимые органические изменения стенки воздухоносных путей, это ведет к дефициту нитроксида азота и бронхорелаксации [48, 75]. Таким образом, это может быть причиной отсутствия различий между сократительными реакциями между сегментами с эпителием и без эпителия у сенсibilизированных морских свинок, тогда как у животных контрольной группы при сохраненной функции эпителия амплитуда сокращения сегментов ниже, чем после его удаления.

3.2.2. Исследование особенностей адренергической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях формирования гиперреактивности

В данном разделе представлены результаты экспериментов по изучению влияния агониста β_2 -адренорецепторов сальбутамола (на фоне предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса) в концентрации 0,01 нМ – 10 мкМ на механическое напряжение сегментов бронхов морских свинок.

У интактных сегментов животных контрольной группы сальбутамол в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ вызывал дозозависимое снижение механического напряжения (рис. 13), максимальная величина расслабления на концентрацию сальбутамола 10 мкМ в контрольной группе достигала $81,42 \pm 2,66$ % от амплитуды предсокращения ($n=14$).

Сальбутамол вызывает бронходилатацию в первую очередь в результате непосредственной стимуляции β_2 -адренорецепторов ГМ ВП. Стимуляция β_2 -адренорецепторов приводит к активации аденилатциклазы, что приводит к повышению содержания внутриклеточного цАМФ, который посредством активации кальций – зависимой калиевой проводимости способствует реполяризации мембраны, а за счет влияния на кальциевые насосы плазмолеммы и саркоплазматического ретикулума и фосфорилирования киназы легких цепей миозина - расслаблению ГМ [103, 155].

При изучении воздействия сальбутамола на деэпителизированные сегменты морских свинок контрольной группы, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса, мы выявили дозозависимое расслабление всех сегментов на концентрации 0,01 нМ – 10 мкМ, максимальная амплитуда расслабления составила $59,59 \pm 3,05$ % ($n=11$). При этом степень расслабления на воздействие сальбутамола была достоверно больше (рис. 13) у

деэпителизированных сегментов на концентрации 1 мкМ ($p < 0,05$) и 10 мкМ ($p < 0,05$). Таким образом, удаление эпителия приводило к усилению дилатационных реакций сегментов воздухоносных путей морских свинок контрольной группы. Можно предположить, что катехоламины на фоне предсокращения гиперкалиевым раствором Кребса модулируют влияние эпителия либо за счет угнетения выработки релаксирующих факторов, либо - усиления продукции констрикторных, на роль которых претендуют простагландины, лейкотриены [135].

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние салбутамола на интактные сегменты сенсibilизированных овальбумином морских свинок, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса. Интактные сегменты отвечали дозозависимым расслаблением на воздействие салбутамола в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ (рис. 14), максимальная величина расслабления достигала $70,42 \pm 2,06$ % от амплитуды предсокращения ($n=8$). На концентрации салбутамола 1 мкМ и 10 мкМ дилатационные реакции интактных сегментов экспериментальной группы были достоверно сильнее, чем сегментов контрольной группы (рис. 14). Разница в величине реакции на концентрацию салбутамола 1 мкМ составила 11,99 % ($p < 0,05$), 100 мкМ – 11,01 % ($p < 0,05$). Возможно, что такие изменения эпителия при сенсibilизации как десквамация, гиперплазия бокаловидных клеток и отек приводят к необратимым повреждениям и потере эпителием способности выделять не только релаксирующие факторы, но также и констрикторные [93, 92].

При исследовании влияния салбутамола на деэпителизированные сегменты сенсibilизированных морских свинок было выявлено, что все сегменты отвечали дозозависимым расслаблением на воздействие салбутамола в концентрациях 0,1 нМ – 10 мкМ (рис. 15). Максимальное расслабление на воздействие салбутамола в концентрации 10 мкМ составило $77,99 \pm 3,41$ % от амплитуды предсокращения ($n=14$).

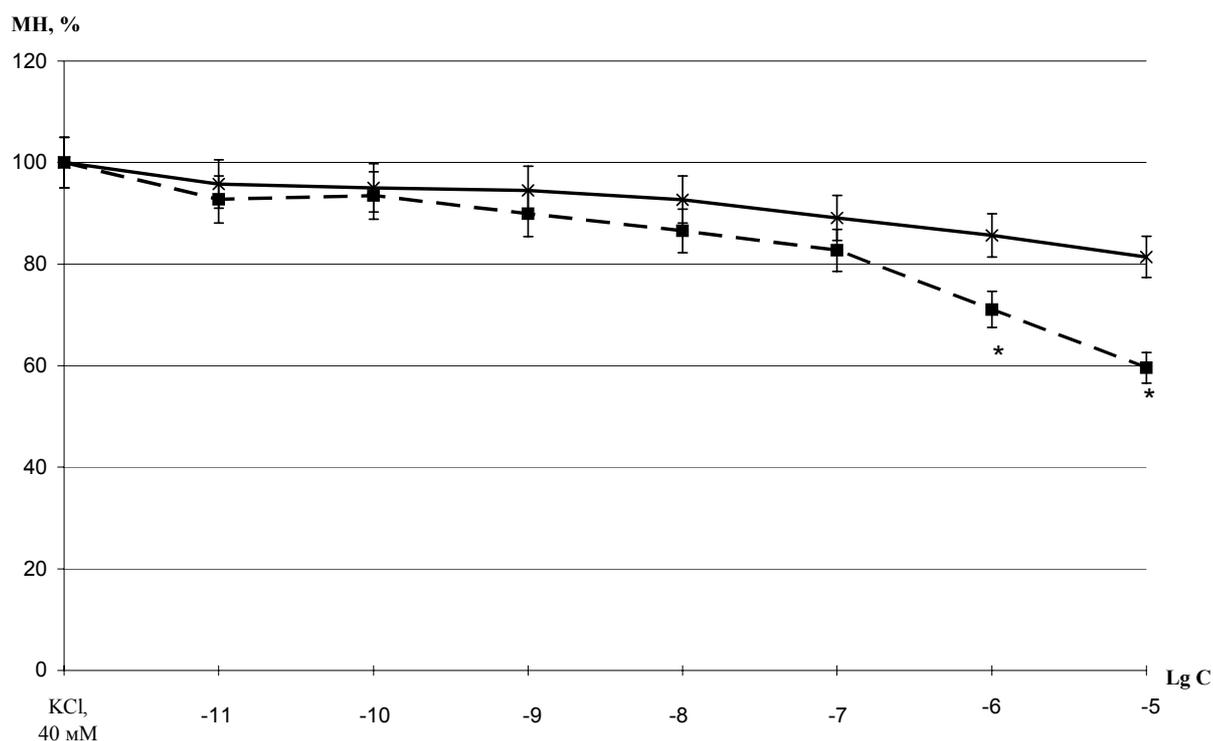


Рис. 13. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации сальбутамола.

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием.

Пунктирная линия – сегменты без эпителия.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах ответных реакций сегментов с сохраненным эпителием и без эпителия.

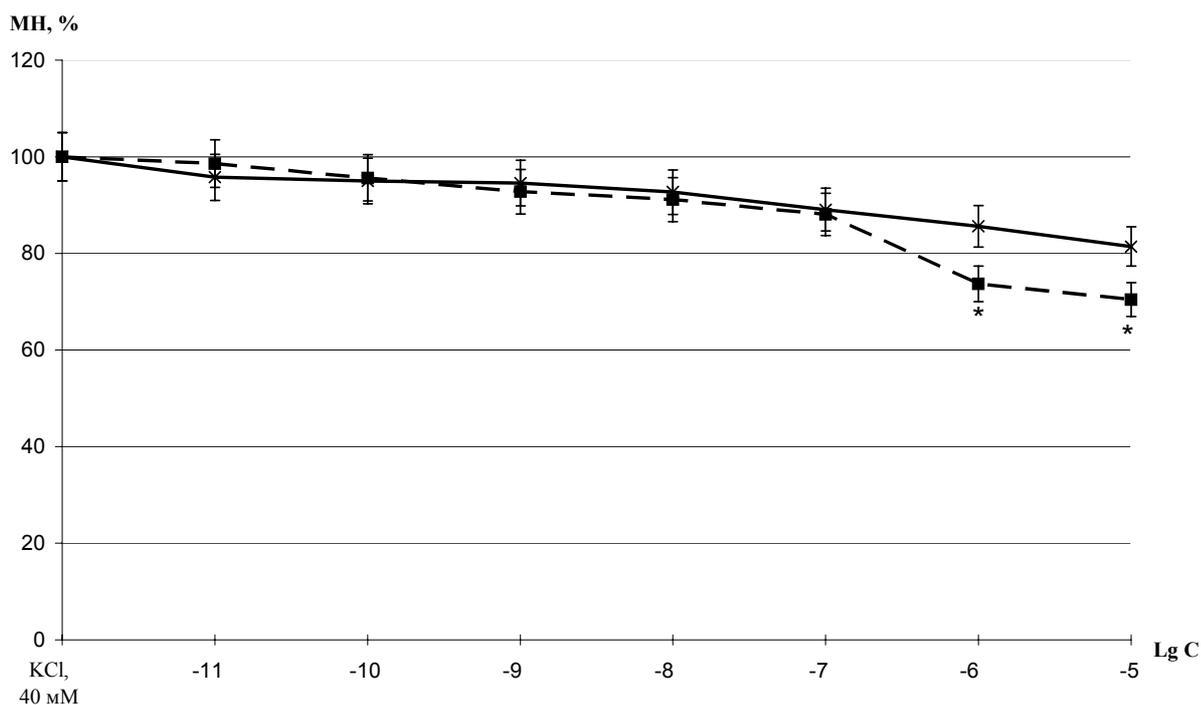


Рис. 14. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок (эпителий сохранен), предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации сальбутамола.

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах ответных реакций сегментов морских свинок контрольной группы и сенсibilизированных.

При сравнении величины расслабления интактных и деэпителизированных сегментов экспериментальной группы достоверной разницы выявлено не было (рис. 15). Это может быть связано с тем, что при повреждении, связанном с развитием патологического состояния, эпителий теряет способность модулировать ответные реакции гладких мышц на адренергические воздействия [74].

Но при сравнении амплитуд расслабления деэпителизированных сегментов контрольной и экспериментальной групп было обнаружено достоверно более сильное расслабление сегментов животных контрольной группы (рис. 16) на концентрации сальбутамола 1 мкМ ($p < 0,05$) и 10 мкМ ($p < 0,05$).

Эти данные могут подтверждать информацию, полученную с помощью ауторадиографического метода, об уменьшении количества β -адренорецепторов как в эпителии, так и в гладких мышцах [133].

В следующей серии экспериментов исследовалось влияние сальбутамола на механическое напряжение сегментов, предсокращенных гистамином в концентрации 100 мкМ. Гистамин считается основным медиатором воспаления при БА, вызывающим развитие бронхоспазма [148]. У людей, больных БА, сальбутамол широко используется для купирования приступов бронхоспазма [50].

Интактные сегменты контрольной группы, предсокращенные гистамином (100 мкМ), на воздействие 0,01 нМ – 10 мкМ сальбутамола отвечали дозозависимым расслаблением. Максимальная амплитуда расслабления составила $-18,06 \pm 1,02$ % ($n=10$) (от амплитуды предсокращения на гистамин) на концентрацию сальбутамола 10 мкМ (рис. 17).

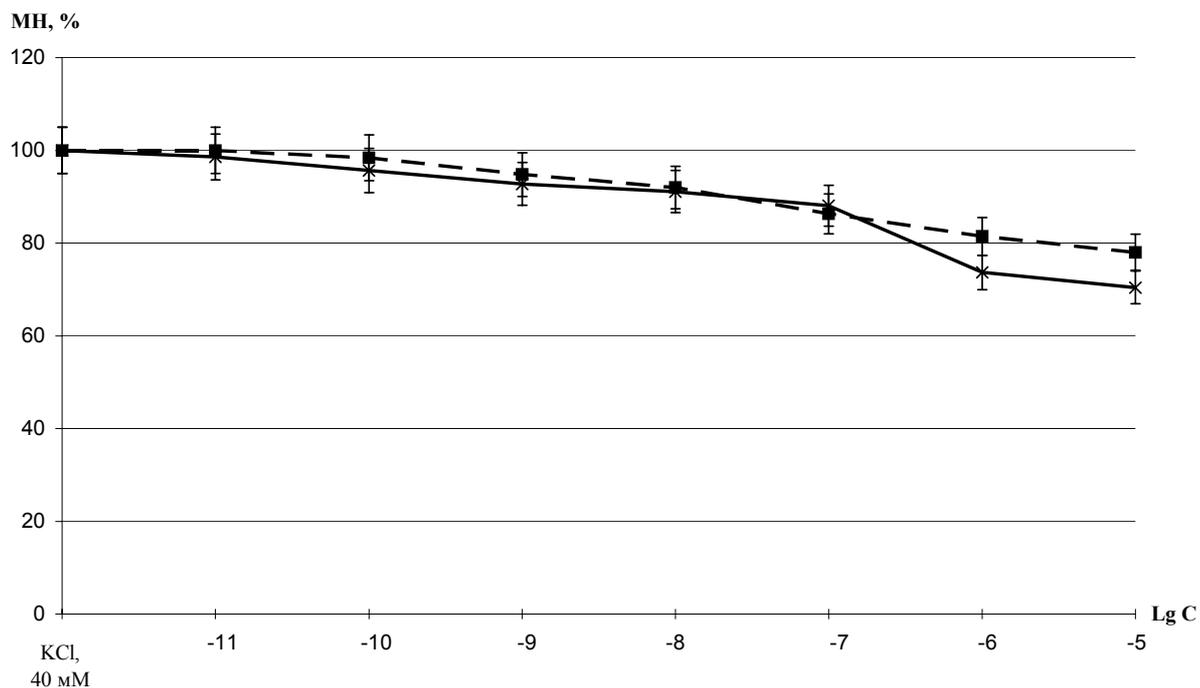


Рис. 15. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов сенсibilизированных морских свинок, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации сальбутамола.

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием.

Пунктирная линия – сегменты без эпителия.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

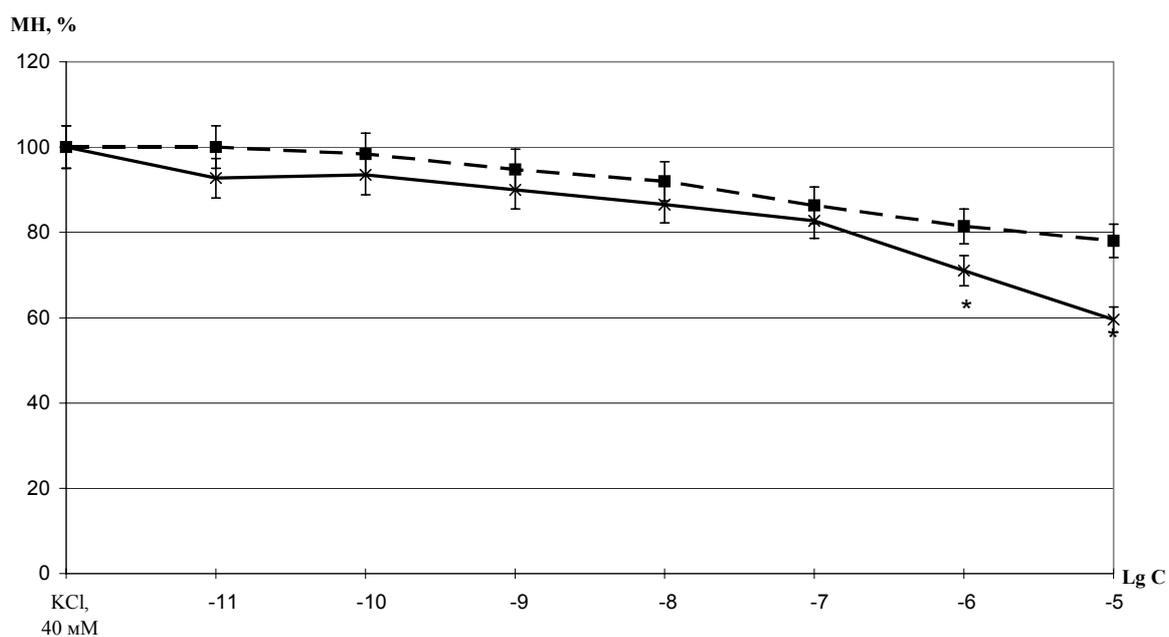


Рис. 16. Зависимость механического напряжения (МН) деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, предсокращенных гиперкалиевым раствором Кребса, от концентрации сальбутамола.

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты sensibilizированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах ответных реакций сегментов морских свинок контрольной группы и sensibilizированных.

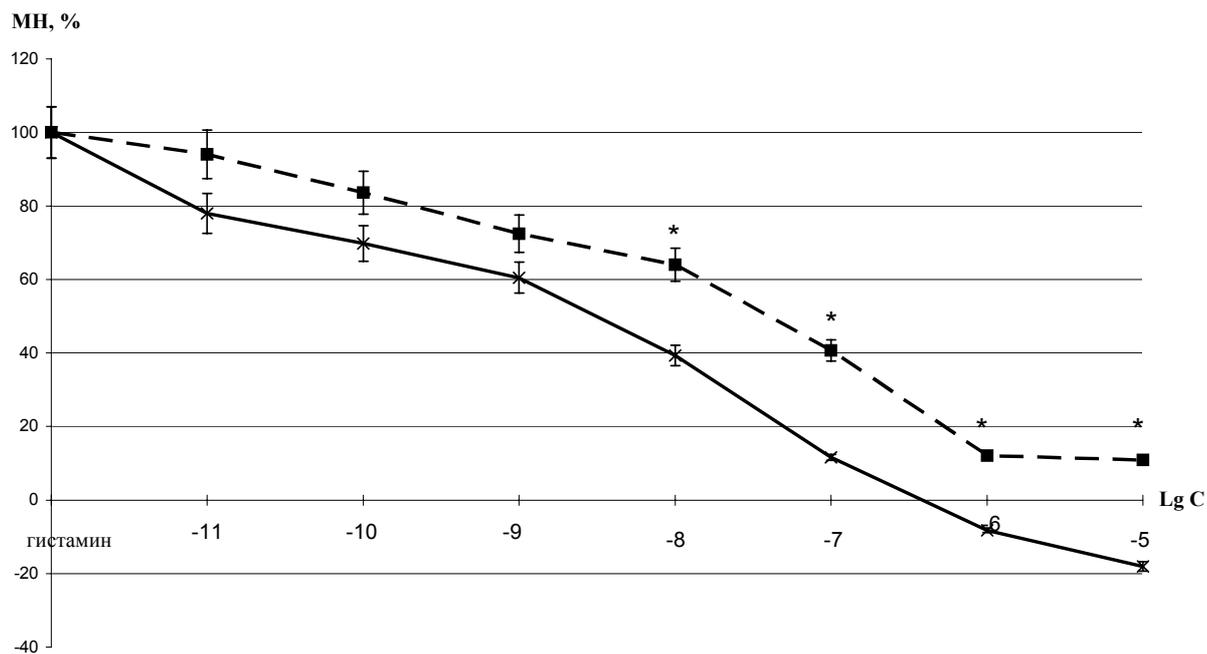


Рис. 17. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы, предсокращенных гистамином (100 мкМ), от концентрации сальбутамола.

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием.

Пунктирная линия – сегменты без эпителия.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на 100 мкМ гистамина.

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах ответных реакций сегментов с сохраненным эпителием и без эпителия.

Релаксирующее действие сальбутамола на ГМ бронхов реализуется через β_2 -адренорецепторы. Активация этого класса адренорецепторов в гладких мышцах запускает классический аденилатциклазный путь, приводящий к снижению сократительной активности [103, 50].

При исследовании влияния сальбутамола на деэпителизированные сегменты контрольной группы было выявлено, что сальбутамол в концентрациях 0,01 нМ – 10 мкМ вызывает дозозависимое расслабление (рис. 17). Максимальное расслабление наблюдалось при воздействии концентрации сальбутамола 10 мкМ, амплитуда расслабления составила $10,94 \pm 0,46$ % от амплитуды предсокращения на гистамин (n=12).

Реакция адренергического расслабления была более выражена у деэпителизированных сегментов по сравнению с интактными (рис. 17). Достоверные различия были обнаружены на воздействие сальбутамола в концентрациях 0,01 мкМ ($p < 0,05$), 0,1 мкМ ($p < 0,05$), 1 мкМ ($p < 0,01$) и 10 мкМ ($p < 0,01$).

Таким образом, эпителий усиливал расслабляющий эффект сальбутамола. Вклад эпителия в реализацию адренергического расслабления гладких мышц бронхов при высоком гистаминергическом тоне обусловлен, вероятно, совместной активацией адрен- и гистаминергических механизмов [4]. Очевидно, сальбутамол способен потенцировать продукцию эпителием релаксирующего фактора при предсокращении гистамином.

При воздействии сальбутамола на интактные сегменты сенсibilизированных морских свинок было выявлено дозозависимое расслабление всех исследуемых сегментов на концентрации сальбутамола 0,01 нМ – 10 мкМ (рис. 18). При максимуме расслабления МН сегментов составило $3,86 \pm 0,22$ % (n=8) от амплитуды предсокращения.

При сравнении изменения механического напряжения интактных сегментов контрольной и экспериментальных групп было обнаружено, что в

ряду концентраций сальбутамола 0,1 нМ – 10 мкМ амплитуда расслабления у сегментов экспериментальной группы была достоверно меньше ($p < 0,05$ для всех случаев), чем у сегментов контрольной группы (рис. 18).

Возможно, поврежденный эпителий сегментов сенсibilизированных животных, как и в случае с гистаминергической активацией, не способен выделять релаксирующий фактор, и поэтому расслабление у сегментов экспериментальной группы происходит только за счет гладкомышечного компонента [93, 92].

При тестировании сальбутамолом деэпителизированных сегментов сенсibilизированных морских свинок также наблюдалось дозозависимое расслабление на 0,01 нМ – 10 мкМ сальбутамола. Максимальная амплитуда расслабления составила $5,59 \pm 0,48$ % ($n=12$) от амплитуды предсокращения на 100 мкМ гистамина (рис. 19).

Достоверных различий между реакциями интактных и деэпителизированных сегментов экспериментальной группы выявлено не было (рис. 19). Также не было выявлено достоверных различий между деэпителизированными сегментами контрольной и экспериментальной групп (рис. 20).

Таким образом, различия в дилатационных реакциях на воздействие сальбутамола между сегментами контрольной и экспериментальной групп при предварительном предсокращении гистамином, носят эпителий-зависимый характер: при удалении эпителия (модель «выключения» органа) различия исчезают.

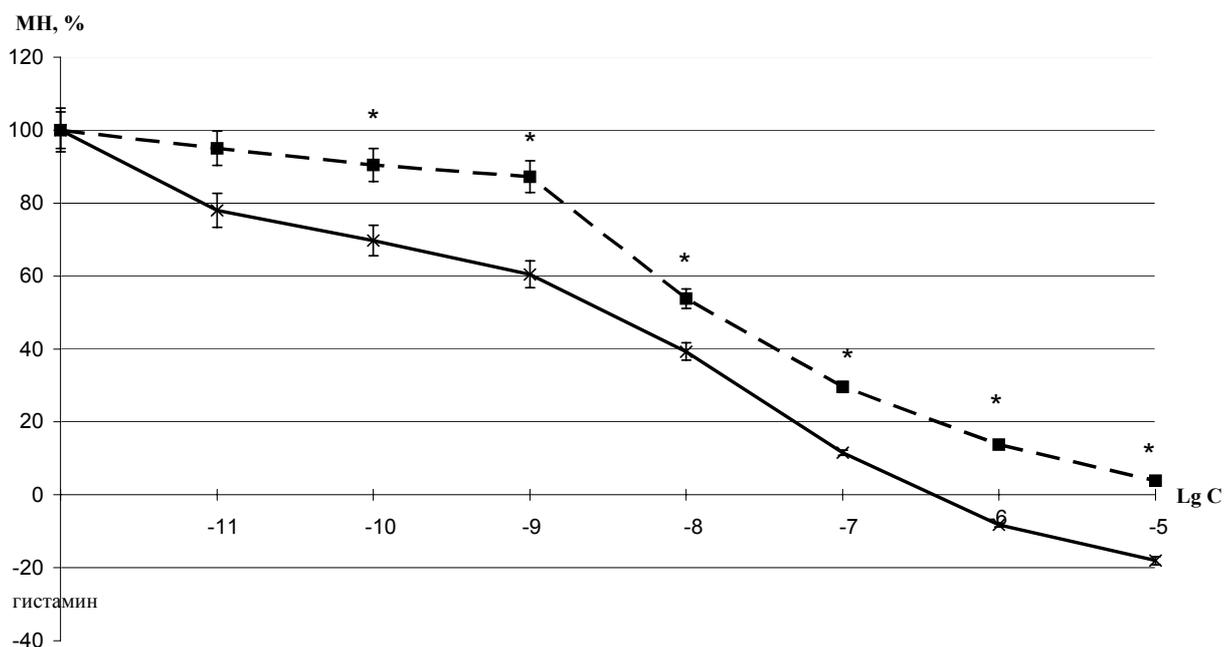


Рис. 18. Зависимость механического напряжения (МН) интактных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, предсокращенных гистамином (100 мкМ), от концентрации сальбутамола (с эпителием).

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты sensibilizированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на 100 мкМ гистамина.

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах ответных реакций сегментов морских свинок контрольной группы и sensibilizированных.

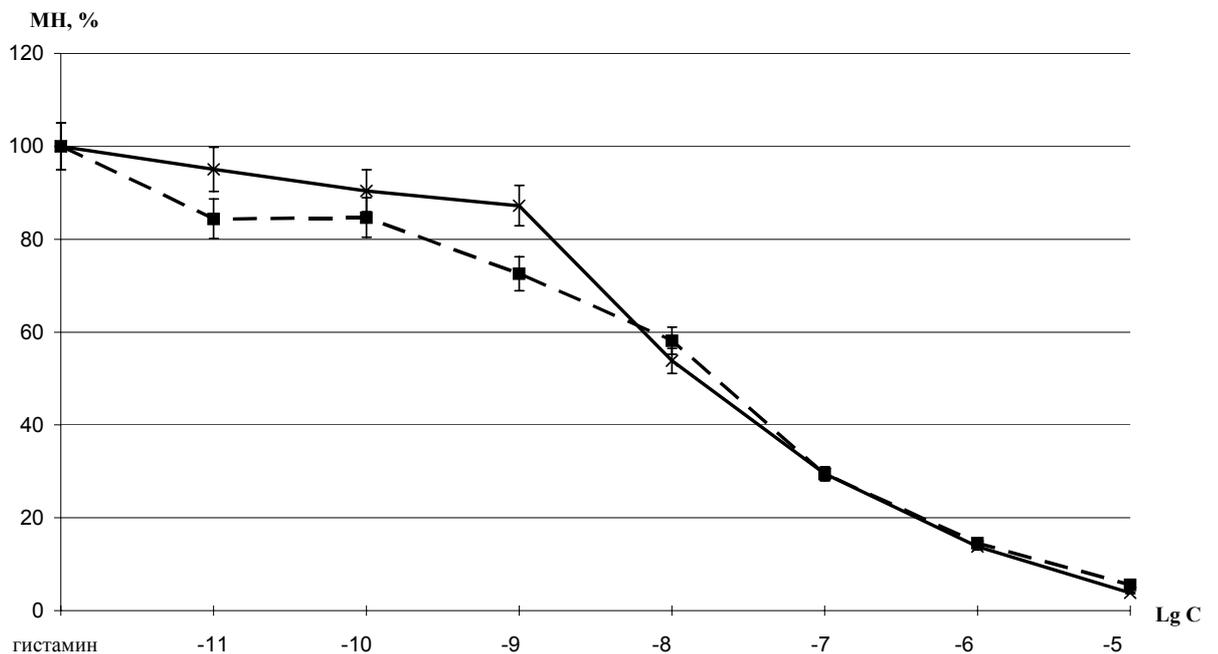


Рис. 19. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов сенсibilизированных морских свинок, предсокращенных гистамином (100 мкМ), от концентрации сальбутамола.

Сплошная линия – сегменты с сохраненным эпителием.

Пунктирная линия – сегменты без эпителия.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на 100 мкМ гистамина.

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

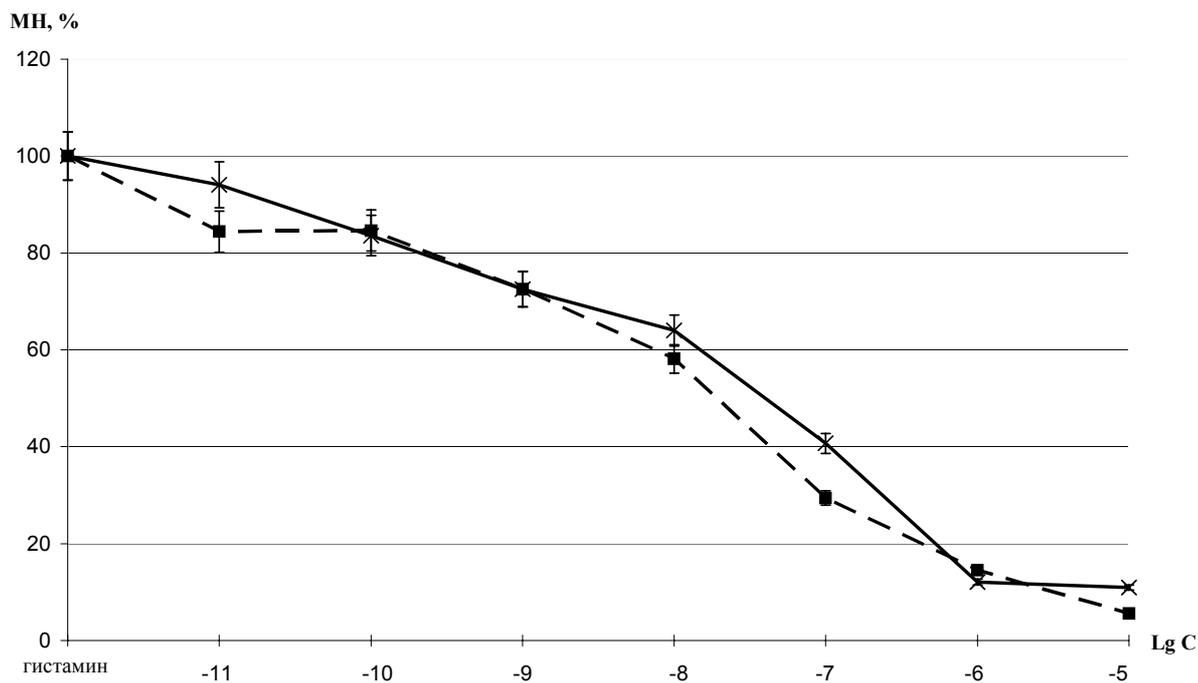


Рис. 20. Зависимость механического напряжения (МН) деэпителизированных гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок, предсокращенных гистамином (100 мкМ), от концентрации сальбутамола.

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на 100 мкМ гистамина.

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

В клинике β_2 -адреномиметики используются как препараты, вызывающие бронходилатацию посредством взаимодействия со своими рецепторами в ГМ воздухоносных путей. Доказательство этого механизма были получены как *in vitro* (при воздействии сальбутамола происходит расслабление бронхов человека и отрезков легочной ткани), так и *in vivo* (быстрое падение сопротивления дыхательных путей после ингаляции бронхолитика) [70].

Стимуляция β_2 -адренорецепторов приводит к активации аденилатциклазы, образуется комплекс с G-протеином под воздействием которого повышается содержание внутриклеточного цАМФ. Последняя приводит к активации специфической киназы (ПК-А), которая фосфорилирует некоторые внутриклеточные белки, в результате чего происходит снижение внутриклеточной концентрации кальция (активное его перекачивание из клетки во внеклеточное пространство), тормозится гидролиз фосфоинозиотида, ингибируются киназы легких цепей миозина, и наконец, «открываются» кальций – активируемые калиевые каналы большой проводимости, обуславливающие реполяризацию (расслабление ГМК и секвестрацию кальция во внеклеточное депо) [103, 155].

β_2 -агонисты могут связываться с калиевыми каналами и непосредственно вызывать релаксацию ГМК независимо от повышения внутриклеточной концентрации цАМФ [70, 122].

Агонисты β_2 -адренорецепторов вызывают расслабление бронхов вне зависимости от имевшего место предварительного констрикторного воздействия, что и наблюдалось в данном исследовании. Это обстоятельство представляется чрезвычайно важным, так как многие медиаторы воспаления и нейротрансмиттеры обладают бронхоконстрикторным действием [116].

Тем не менее, степень расслабления бронхов на воздействие сальбутамола при этом зависит от характера предсокращающего фактора. Если предсокращение проводится гиперкалиевым раствором Кребса, то

эпителий выделяет констрикторные факторы. На роль выделяемых эпителием факторов констрикции претендуют простаноиды и пептидсодержащие лейкотриены C₄ и E₄ [135]. Такой же эффект описан в работе по исследованию адренергической регуляции воздухоносных путей кролика [4], других данных в доступной литературе обнаружено не было, что не позволяет более подробно интерпретировать полученные в этой серии экспериментов данные.

Если же в качестве предсокращающего фактора выступает гистамин, то эпителий вовлекается в реакции расслабления, усиливая их, видимо, выделяя релаксирующий фактор, возможно, NO.

При сенсibilизации эпителий «выключается» из адренергических реакций, не оказывая существенного вклада в ответные реакции, что может быть объяснено повреждением эпителия морфологического и функционального характера и потерей им эндокринных функций [75, 189].

Многие исследователи не признают снижение плотности β-рецепторов в качестве причины развития бронхиальной астмы, однако это обстоятельство, доказанное с помощью ауторадиографического метода [133] может служить фактором, обуславливающим снижение чувствительности бронхов к катехоламинам.

Кроме того, на плотность β-адренорецепторов при сенсibilизации может влиять фактор активации тромбоцитов, который является не только хемотаксическим фактором эозинофилов [125], но также способен уменьшать количество β-адренорецепторов, что доказано в экспериментальных исследованиях [161].

В результате воздействия на β-адренорецепторы, локализующихся в различных отделах дыхательных путей, выявляются дополнительные эффекты β₂-агонистов, которые объясняют возможность профилактического использования препаратов. В их числе угнетение высвобождения медиаторов

из клеток воспаления, уменьшается проницаемость капилляров (предотвращение развития отека слизистой бронхов), угнетение холинергической передачи (уменьшение холинергической рефлекторной бронхоконстрикции), модуляция продукции слизи под слизистыми железами, следовательно оптимизация мукоцилиарного клиренса [50].

3.2.3. Исследование особенностей холинэргической регуляции сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях формирования гиперреактивности

Для изучения холинергической регуляции ГМ бронхов использовали агонист $M_{2,3}$ -холинорецепторов – пилокарпин в концентрациях 0,1 нМ – 100 мкМ.

В первой серии экспериментов было изучено влияние пилокарпина на интактные сегменты контрольной группы. Пилокарпин вызывал дозозависимое сокращение всех интактных сегментов в концентрации 0,1 нМ – 100 мкМ. Максимум амплитуды сокращения наблюдался на 100 мкМ пилокарпина и составил $69,87 \pm 2,54$ % (n=12).

Стимуляция M_2 -холинорецепторов приводит к подавлению активности аденилатциклазы, вероятно это связано с оккупацией M_2 -холинорецепторов сарколеммы, сопряженных с аденилатциклазой посредством G_i -белка [49]. Воздействие на M_3 -холинорецепторы сопровождается повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Эти процессы приводят к развитию сокращения.

При действии пилокарпина на деэпителизированные сегменты контрольной группы также наблюдалось дозозависимое сокращение всех сегментов в ответ на концентрации агониста 0,1 нМ – 100 мкМ. При этом максимальная амплитуда на 100 мкМ пилокарпина была достоверно меньше, чем у интактных сегментов и составила $43,27 \pm 3,24$ % (p<0,001, n=18,).

Полученные данные позволяют предположить, что при холинергической стимуляции бронхов эпителий может либо усиливать выработку констрикторных факторов, либо угнетать – релаксирующих, как и в случае адренергической стимуляции при предсокращении гиперкалиевым раствором Кребса.

В следующей серии экспериментов было исследовано влияние пилокарпина на интактные сегменты сенсibilизированных морских свинок. Все исследуемые сегменты отвечали сокращением, максимальная амплитуда составила $58,54 \pm 1,36$ % ($n=9$) на концентрацию пилокарпина 100 мкМ. Достоверной разницы между амплитудами сократительных реакций интактных сегментов контрольной и экспериментальной группами выявлено не было.

Увеличение механического напряжения также наблюдалось при воздействии пилокарпина на деэпителизированные сегменты сенсibilизированных морских свинок. Максимум сокращения наблюдался на 100 мкМ пилокарпина, амплитуда равнялась $74,46 \pm 3,71$ % ($n=13$). Достоверных различий между амплитудами сокращения интактных и деэпителизированных сегментов экспериментальной группы выявлено не было. Данные этой серии экспериментов также подтверждают угнетение функций эпителия при сенсibilизации.

Достоверное увеличение амплитуды сократительных реакций деэпителизированных сегментов экспериментальной группы было обнаружено по сравнению с деэпителизированными сегментами контрольной группы на концентрации пилокарпина 0,1 мкМ ($p<0,05$), 1 мкМ ($p<0,01$), 10 мкМ ($p<0,05$) и 100 мкМ ($p<0,05$) (рис. 21).

По всей видимости, при сенсibilизации повышается реактивность ГМ респираторного тракта на пилокарпин, что проявляется в увеличении амплитуды сократительных реакций деэпителизированных сегментов.

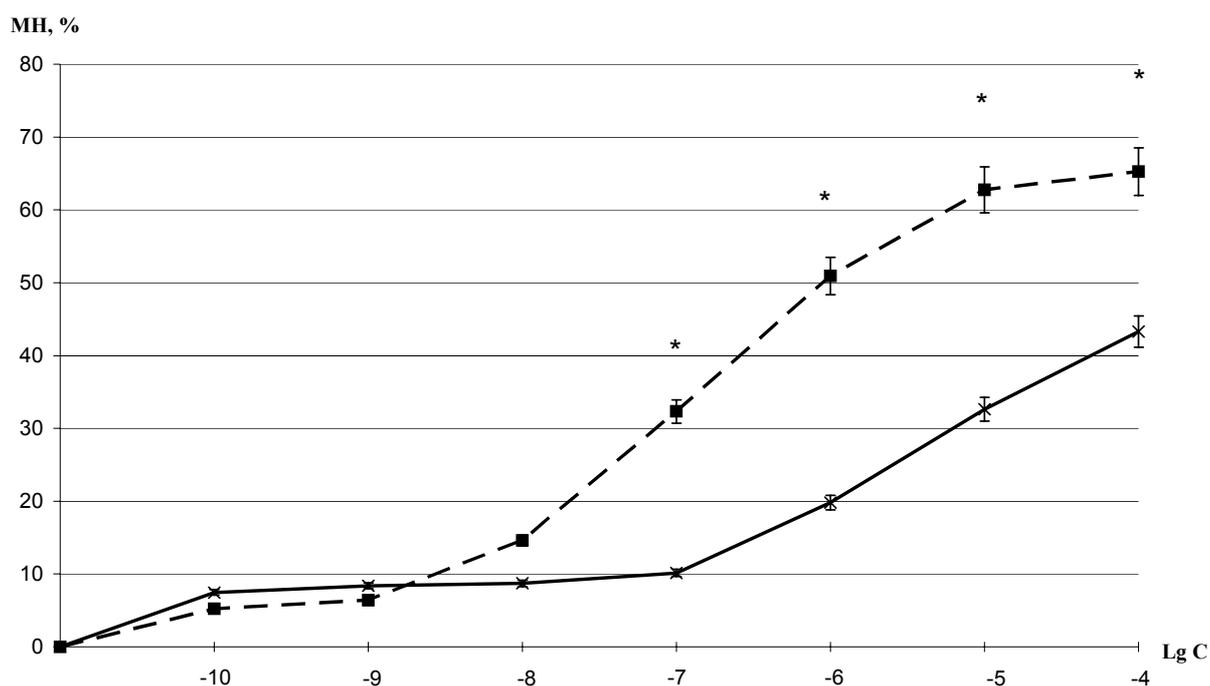


Рис. 21. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации пилокарпина (эпителий удалён).

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации пилокарпина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов морских свинок контрольной группы и сенсibilизированных.

Воздействие пилокарпина на ГМК ВП связано с модификацией свойств многих мембранных ион-транспортирующих систем и ферментов. Оккупация М-холинорецепторов приводит к развитию сокращения ГМК [2]. Стимуляция М₂-холинорецепторов приводит к подавлению активности аденилатциклазы, вероятно это связано с оккупацией М₂-холинорецепторов сарколеммы, сопряженных с аденилатциклазой посредством G_i-белка [49]. Ингибирующее действие G_i-белка осуществляется за счет конкурентного связывания освобождающимися при его активации β-субъединицами α-субъединиц G_s-белка и снижении способности последнего активировать аденилатциклазу [53].

Воздействие на М₃-холинорецепторы сопровождается повышением внутриклеточной концентрации Ca²⁺. В реализации этого эффекта участвуют преимущественно рецепторуправляемые кальциевые каналы.

Данные, полученные на интактных сегментах морских свинок контрольной группы, позволяют предположить, что холинергическая стимуляция бронхов может усиливать выработку эпителием констрикторных факторов (таких как простагландины, лейкотриены, ацетилхолин [130, 135]), либо угнетать выработку релаксирующего фактора. При повреждении в результате сенсibilизации эпителий утрачивает такую способность. Потенцирование пилокарпином выделения эпителием сократительных факторов было получено в данной работе впервые. Отсутствие подобных результатов в доступной литературе не позволяет более подробно интерпретировать полученные результаты.

Многие исследователи считают, что *in vivo* важную роль в развитии гиперреактивности при БА играет развивающаяся дисфункция М₂-холинорецепторов. В норме М₂-холинорецепторы тормозят выход ацетилхолина при стимуляции блуждающего нерва, при их повреждении в следствие сенсibilизации возникает бронхиальная гиперреактивность, связанная с блуждающим нервом. Функции М₃-холинорецепторов остаются нормальными [73]. Но количество М₃-холинорецепторов воздухоносных

путей, зарегистрированное у овальбумин-сенсibilизированных морских свинок, повышено, тогда как плотность M_2 -рецепторов не изменяется [169]. Таким образом, увеличение амплитуды сократительных реакций изолированных гладких мышц воздухоносных путей на воздействие пилокарпина при сенсibilизации может объясняться повышением количества M_3 -холинорецепторов.

3.3. Влияние интерлейкина 5 на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях формирования гиперреактивности

В данном разделе диссертации представлены результаты исследования влияния ИЛ-5 на сократительную активность деэпителизированных сегментов воздухоносных путей морских свинок.

В первой серии экспериментов было изучено непосредственное влияние ИЛ-5 на тонус сегментов. Для этого ИЛ-5 добавляли в кювету с сегментами в концентрациях 1 пг/мл, 0,01нг/мл, 0,1нг/мл, 1 нг/мл и 0,01мкг/мл. Было установлено, что ИЛ-5 в указанных концентрациях не оказывал влияние на механическое напряжение сегментов.

Это подтверждается исследованием влияния ИЛ-5 на реактивность воздухоносных путей при его ингаляции [159]. При ингалировании ИЛ-5 людям с легкой степенью астмы показатели спирометрии оставались прежними, как до ингаляции.

Для проведения второй серии экспериментов изолированные деэпителизированные сегменты предварительно в течение 18 часов инкубировали в термостате при температуре 25⁰С в среде RPMI-1640 с добавлением ИЛ-5 (концентрация 0,1 мкг/мл). После этого сегменты тестировались воздействием гистамина и сальбутамола, аналогично тому, как

это было описано выше.

Инкубация с ИЛ-5 приводила к существенному увеличению амплитуды сократительных реакций гладких мышц бронхов на воздействие гистамина как у сенсibilизированных животных, так и у животных контрольной группы. Было выявлено повышение амплитуды сокращения на воздействие гистамина в концентрации 10 и 100 мкМ как в контрольной ($p < 0,05$, $n=13$) (рис. 22), так и в экспериментальной группах ($p < 0,05$, $n=9$) (рис. 23).

Максимальная амплитуда сокращения сегментов, полученных от интактных животных, составила $53,65 \pm 1,82$ %, ($n=8$), после инкубации с ИЛ-5 – $98,37 \pm 6,45$ % ($n=13$). Максимальная амплитуда сокращения сегментов гладких мышц бронхов, полученных от животных экспериментальной группы, составила $89,74 \pm 6,49$ %, ($n=18$), а сегментов, инкубированных с ИЛ-5 - $115,19 \pm 6,23$ % ($n=9$).

Поскольку инкубация сегментов с ИЛ-5 приводит к столь значительному повышению их реактивности на гистамин, то можно предположить, что ИЛ-5 оказывает непосредственное влияние на их функциональное состояние. Действие этого цитокина может опосредоваться через рецепторный комплекс [164, 166]. Рецепторы к ИЛ-5 найдены в гладких мышцах воздухоносных путей [71, 177]. Значит, взаимодействуя с своими рецепторами ГМ, ИЛ-5 посредством неизвестных на данный момент механизмов может изменять реактивность ГМ на воздействие гистамина. Вполне возможно, что реактивность изменяется не только на гистамин, а на все возможные раздражители. Это может объяснять феномен ИЛ-5-опосредованной бронхиальной гиперреактивности при отсутствии эозинофильного повреждения тканей.

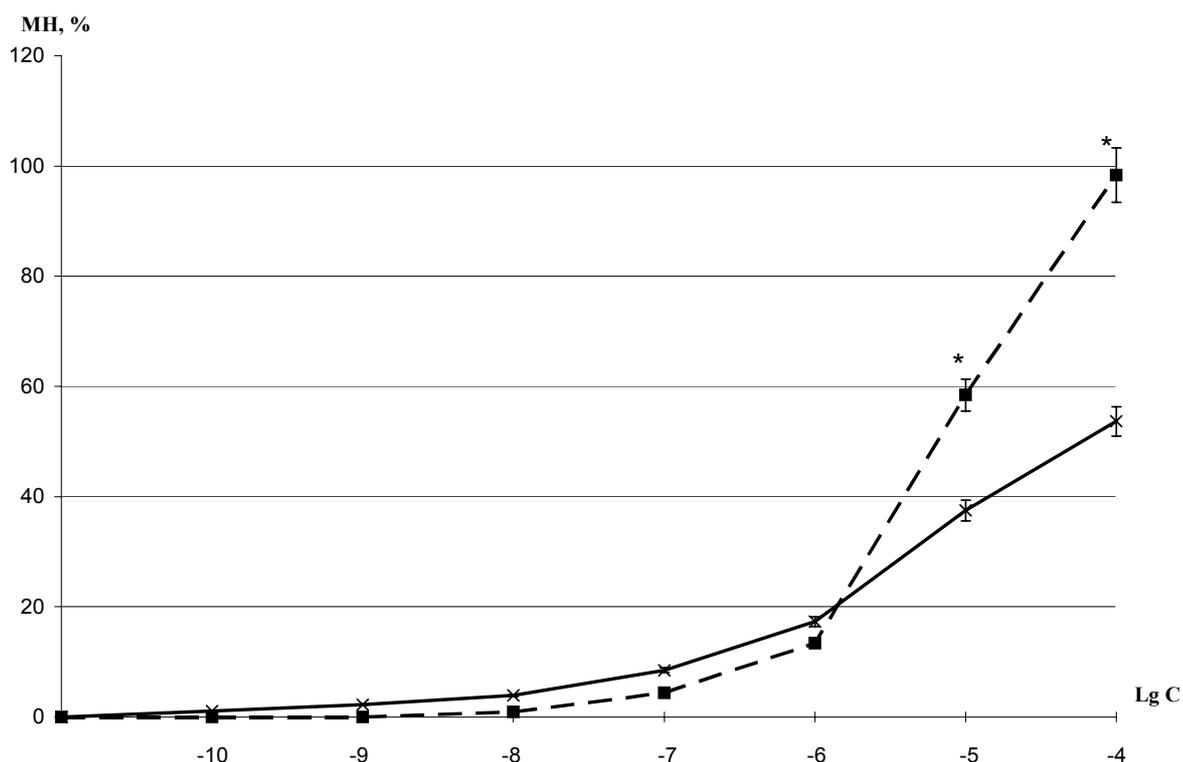


Рис. 22. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина.

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты морских свинок контрольной группы, инкубированные с ИЛ-5.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций неинкубированных сегментов и инкубированных с ИЛ-5.

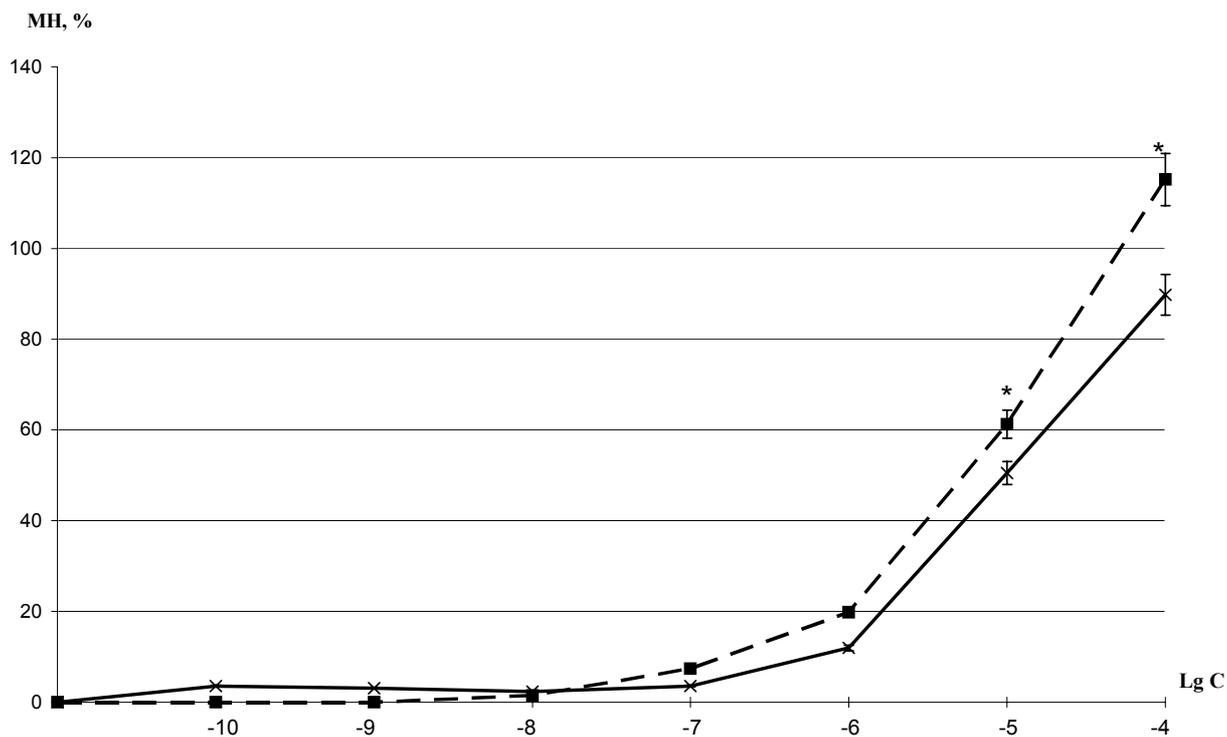


Рис. 23. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина.

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты сенсibilизированных морских свинок.

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с ИЛ-5.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов неинкубированных и инкубированных с ИЛ-5.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние ИЛ-5 на дилатационные реакции ГМ бронхов при действии на них сальбутамола.

Как и в предыдущем эксперименте, изолированные деэпителизированные сегменты инкубировали с ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл. При воздействии сальбутамола на инкубированные с ИЛ-5 сегменты, предсокращенные гиперкалиевым раствором Кребса, наблюдалось уменьшение степени расслабления как в контрольной, так и в экспериментальной группе.

В контрольной группе степень расслабления достоверно уменьшалась при инкубации с ИЛ-5 (рис. 24) на концентрации сальбутамола 1 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$) и 10 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$). У сегментов сенсibilизированных животных, инкубированных с ИЛ-5, амплитуда расслабления сегментов была меньше (рис. 25) на концентрации сальбутамола 0,1 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$), 1 мкМ/мл ($p < 0,05$, $n=6$) и 10 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$).

Таким образом, инкубация с ИЛ-5 приводит к увеличению сократимости гладких мышц бронхов на гистамин. Возможно, что ИЛ-5 индуцирует повышенную готовность к сокращению ГМ изолированных бронхов вообще на все раздражители, в том числе и на гистамин за счет взаимодействия со своими рецепторами на них. Наблюдаемое ИЛ-5 - индуцированное развитие гиперчувствительности гладких мышц бронхов может быть физиологической основой для существования бронхиальной гиперреактивности при бронхиальной астме. Более того, ранее было показано, что для развития бронхиальной гиперчувствительности критическими являются ИЛ-5 и ИЛ-4, но не эозинофилы или IgE [142], то есть ИЛ-5 лиганд-рецепторное взаимодействие на гладких мышцах дыхательных путей может вызывать гиперчувствительность независимо от эозинофил-индуцированного повреждения тканей.

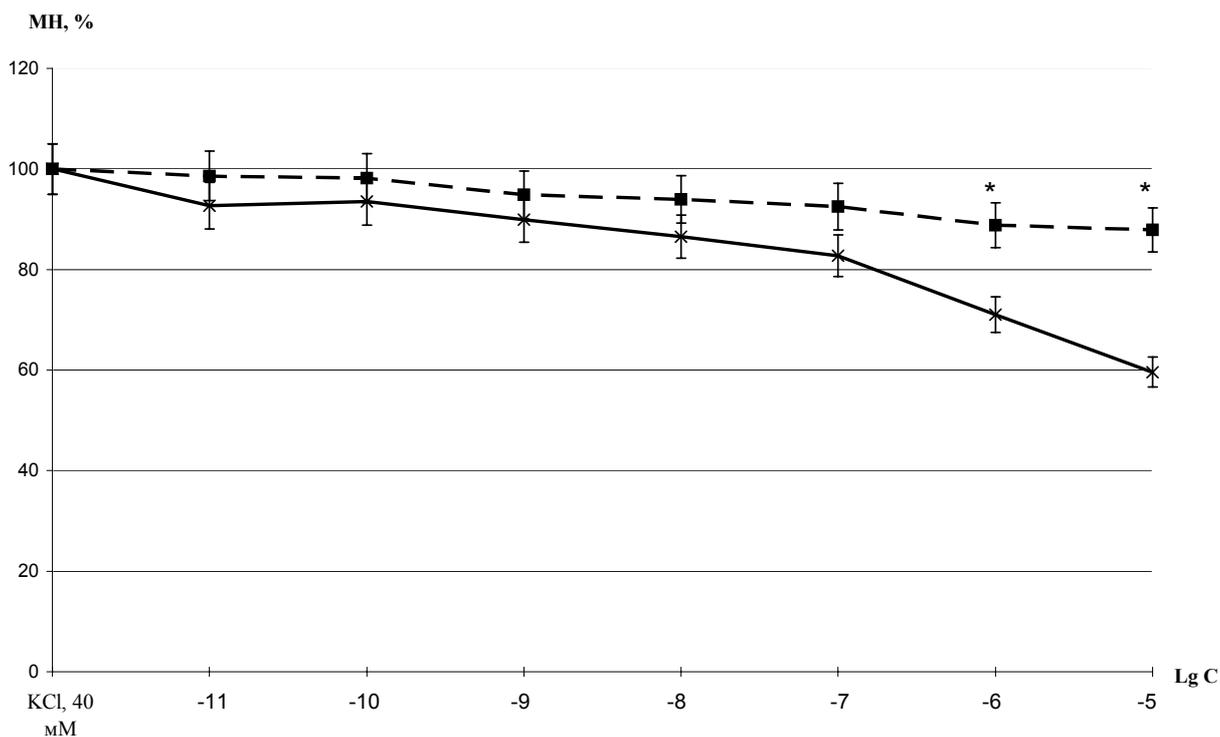


Рис. 24. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации сальбутамола.

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты морских свинок контрольной группы, инкубированные с ИЛ-5.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах ответных реакций сегментов неинкубированных и инкубированных с ИЛ-5.

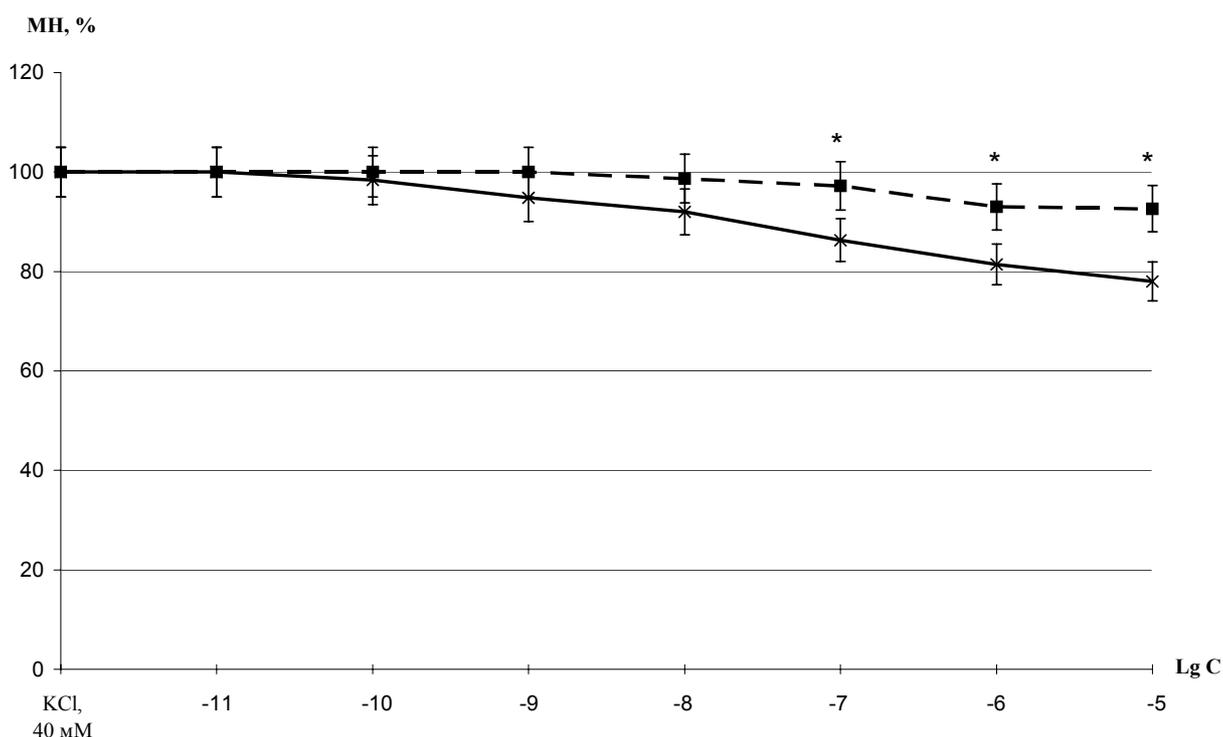


Рис. 25. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации сальбутамола.

Сплошная линия – деэпителизированные сегменты сенсibilизированных морских свинок.

Пунктирная линия – деэпителизированные сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с ИЛ-5.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды предсокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации сальбутамола (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах ответных реакций сегментов неинкубированных и инкубированных с ИЛ-5.

В этом случае основным пулом клеток, которые продуцируют ИЛ-5, могут быть эпителиальные клетки дыхательных путей, для них была показана возможность конститутивно экспрессировать этот цитокин [152]. При этом инкубация гладкомышечных сегментов с ИЛ-5, возможно, посредством тех же механизмов подавляет дилатационные реакции на сальбутамол, что тоже может вносить вклад в повышение сократительных реакций при БА.

3.4. Влияние рекомбинантного рецептора интерлейкина 5 на сократительные реакции гладких мышц воздухоносных путей морских свинок в условиях формирования гиперреактивности

В данном разделе диссертации представлены результаты исследования влияния растворимой изоформы α – рецептора к ИЛ-5 на сократительную активность деэпителизированных сегментов воздухоносных путей морских свинок.

Чтобы предотвратить возникновение токсических и провоспалительных эффектов, возникающих в результате дегрануляции эозинофилов, необходимо блокировать действие ИЛ-5 на эти клетки, то есть блокировать взаимодействие между ИЛ-5 и рецептором к нему. Простым и перспективным подходом такого блокирования является связывание внеклеточного ИЛ-5, и последующая его элиминация. Связывание ИЛ-5 можно осуществить, используя растворимую изоформу α -рецептора к ИЛ-5 [182].

Для проверки рецептор-специфичности описанной выше способности ИЛ-5 потенцировать гиперреактивность бронхов, в следующей серии экспериментов мы провели одновременное инкубирование сегментов в среде с добавлением ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл и α -субъединицей рецептора

ИЛ-5 в концентрациях 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл. И в контрольной и в экспериментальной группах добавление в среду к ИЛ-5 его рецептора приводило к достоверному снижению амплитуды сократительных реакций по сравнению с амплитудами сокращения при инкубации только с ИЛ-5.

У сегментов контрольной группы снижение максимальной амплитуды сокращения при концентрации рецептора 1 мкг/мл составило 63,87% ($p < 0,01$, $n=6$), при концентрации рецептора 5 мкг/мл – 60,68% ($p < 0,01$, $n=6$) (рис. 26).

У сегментов экспериментальной группы максимальная амплитуда уменьшилась при концентрации рецептора 1 мкг/мл на 63,6% ($p < 0,01$, $n=6$), при концентрации 5 мкг/мл – на 54,63% ($p < 0,01$, $n=6$), при концентрации 1 мкг/мл – 43,32% ($p < 0,01$, $n=6$) (рис. 27). При этом максимальная амплитуда сокращения сегментов сенсibilизированных животных оставалась выше амплитуды сокращения сегментов животных контрольной группы (все сегменты инкубированы с ИЛ-5 и α -субъединицей рецептора ИЛ-5) ($p < 0,05$, $n=6$) (рис. 28).

Таким образом, добавление в среду при инкубации рекомбинантного рецептора ИЛ-5 частично блокирует эффекты данного цитокина на гиперреактивность бронхов. Связывая экзогенный ИЛ-5, рецептор тем самым уменьшает сократительные реакции сегментов как интактных, так и сенсibilизированных животных на гистаминергические воздействия. При этом различия, сохраняющиеся в амплитудах сокращений интактных и сенсibilизированных животных, свидетельствуют о важном значении исходного состояния сегментов: возможно, что при сенсibilизации количество эндогенного ИЛ-5 повышено настолько, что необходимы более высокие дозы рецептора ИЛ-5 для полного его связывания.

При этом продукция эндогенного ИЛ-5 при сенсibilизации может происходить в бронхиальной стенке. Для проверки данной гипотезы были выполнены эксперименты по исследованию влияния рецептора ИЛ-5 на

сократительные реакции сегментов воздухоносных путей у интактных и сенсibilизированных животных.

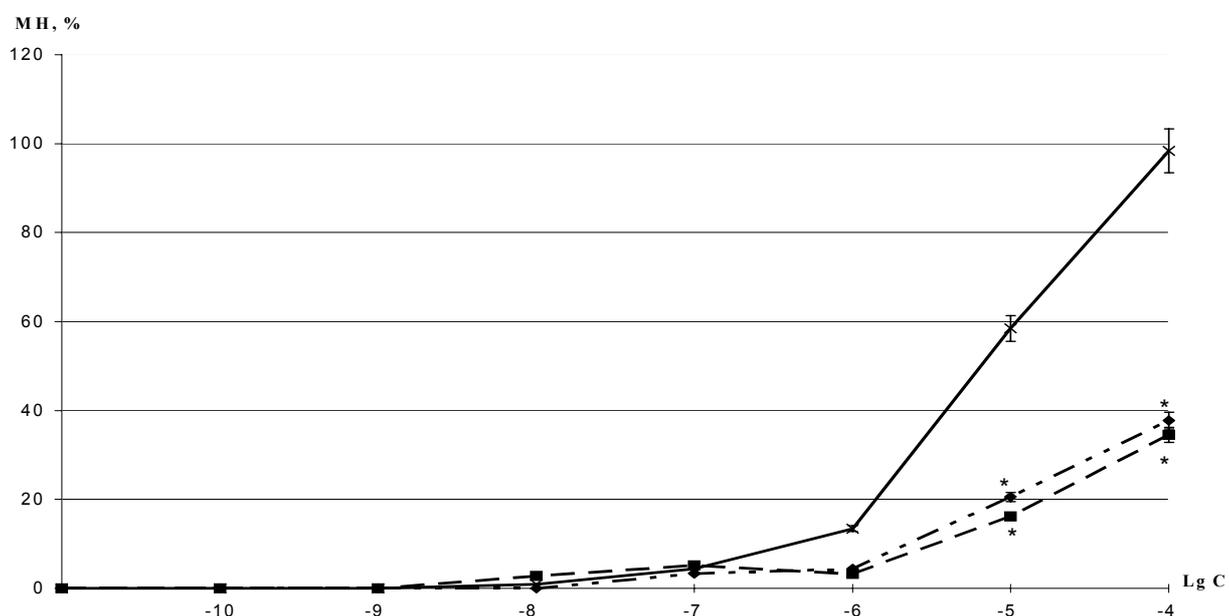


Рис. 26. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина (без эпителия).

— сегменты морских свинок контрольной группы, инкубированные с ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл.

- - ■ - - сегменты морских свинок контрольной группы, инкубированные с ИЛ-5 [0,1 мкг/мл] и рецептором ИЛ-5 в концентрации 1 мкг/мл.

— .●— . — сегменты морских свинок контрольной группы, инкубированные с ИЛ-5 [0,1 мкг/мл] и рецептором ИЛ-5 в концентрации 0,5 мкг/мл.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов инкубированных с рецептором ИЛ-5 и неинкубированных.

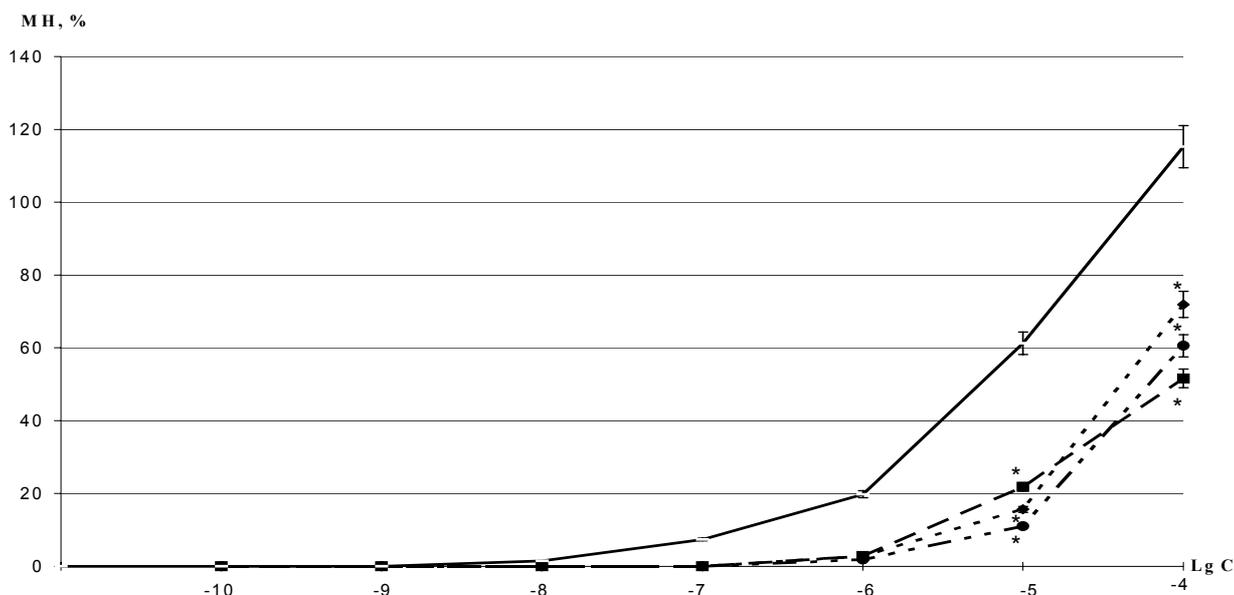


Рис. 27. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина (без эпителия).

— — сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл.

- - ■ - - сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с ИЛ-5 [0,1 мкг/мл] и рецептором ИЛ-5 в концентрации 1 мкг/мл.

— .●— . — сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с ИЛ-5 [0,1 мкг/мл] и рецептором ИЛ-5 в концентрации 0,5 мкг/мл.

.....◆..... — сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с ИЛ-5 [0,1 мкг/мл] и рецептором ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов, инкубированных с рецептором ИЛ-5 и неинкубированных.

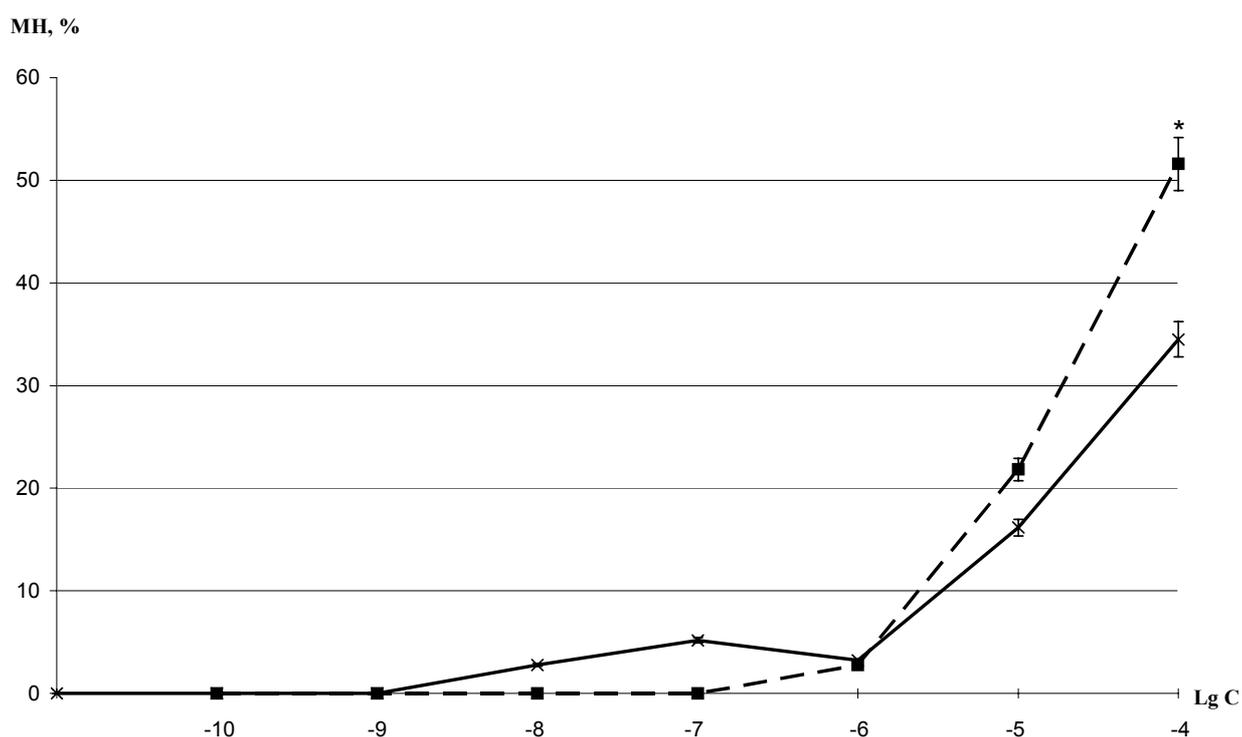


Рис. 28. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина (без эпителия).

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы, инкубированные с ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл и α -субъединицей рецептора ИЛ-5 в концентрации 1 мкг/мл.

Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл и α -субъединицей рецептора ИЛ-5 в концентрации 1 мкг/мл.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов морских свинок контрольной группы и сенсibilизированных.

В следующей серии экспериментов мы проводили инкубацию гладкомышечных сегментов в течение 18 часов при температуре 25⁰С в среде RPMI-1640 с добавлением α -субъединицы рецептора ИЛ-5 в концентрациях 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл.

На инкубированные сегменты воздействовали гистамином в концентрациях 0,1 нМ - 100 мкМ. При инкубации достоверной разницы между амплитудами сокращения сегментов контрольной группы обнаружено не было (рис. 29). У сегментов сенсibilизированных животных достоверное снижение сократительных реакций наблюдалось при инкубации сегментов с рецептором в концентрации 1 мкг/мл (рис. 30).

При этом сократительные реакции сегментов контрольной группы были достоверно выше по сравнению с сегментами группы животных экспериментальной группы (рис. 31) на концентрации гистамина 10 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$) и 100 мкМ ($p < 0,05$, $n=6$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что растворимая α -субъединица рецептора ИЛ-5 способна связывать растворенный в окружающей среде ИЛ-5 и тем самым устранять его действие, направленное на повышение гиперреактивности гладких мышц дыхательных путей.

Кроме того инкубация гладкомышечных сегментов с рецептором ИЛ-5 подавляет сократительные реакции на гистамин, видимо, связывая эндогенный ИЛ-5.

Полученные результаты, на наш взгляд, позволяют обсудить перспективу использования растворимой формы α -субъединицы рецептора ИЛ-5 для блокирования действия ИЛ-5 на клетки, устраняя ИЛ-5-опосредованные эффекты. Такой подход может лечь в основу принципиально нового, патогенетически обоснованного способа коррекции бронхоспастических состояний.

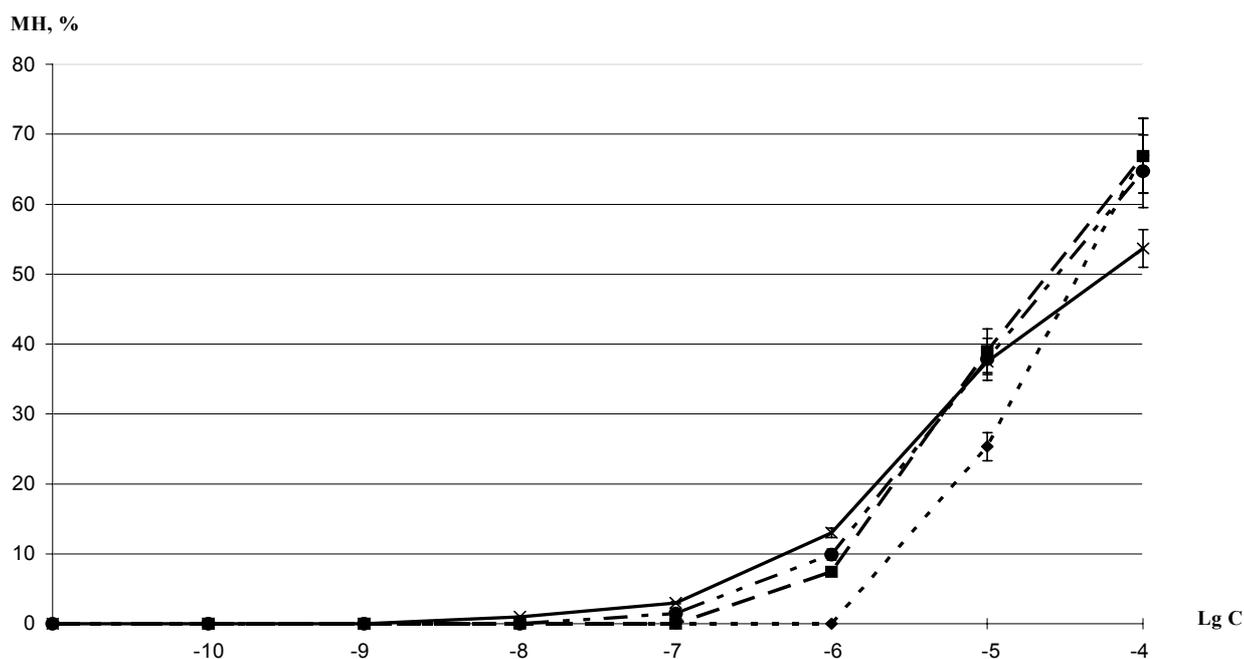


Рис. 29. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина (эпителий удален).

— — — — — сегменты морских свинок контрольной группы.

- - ■ - - сегменты морских свинок контрольной группы, инкубированные с рецептором ИЛ-5 в концентрации 1 мкг/мл.

— .●— . — сегменты морских свинок контрольной группы, инкубированные с рецептором ИЛ-5 в концентрации 0,5 мкг/мл.

.....◆..... — сегменты морских свинок контрольной группы, инкубированные с рецептором ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

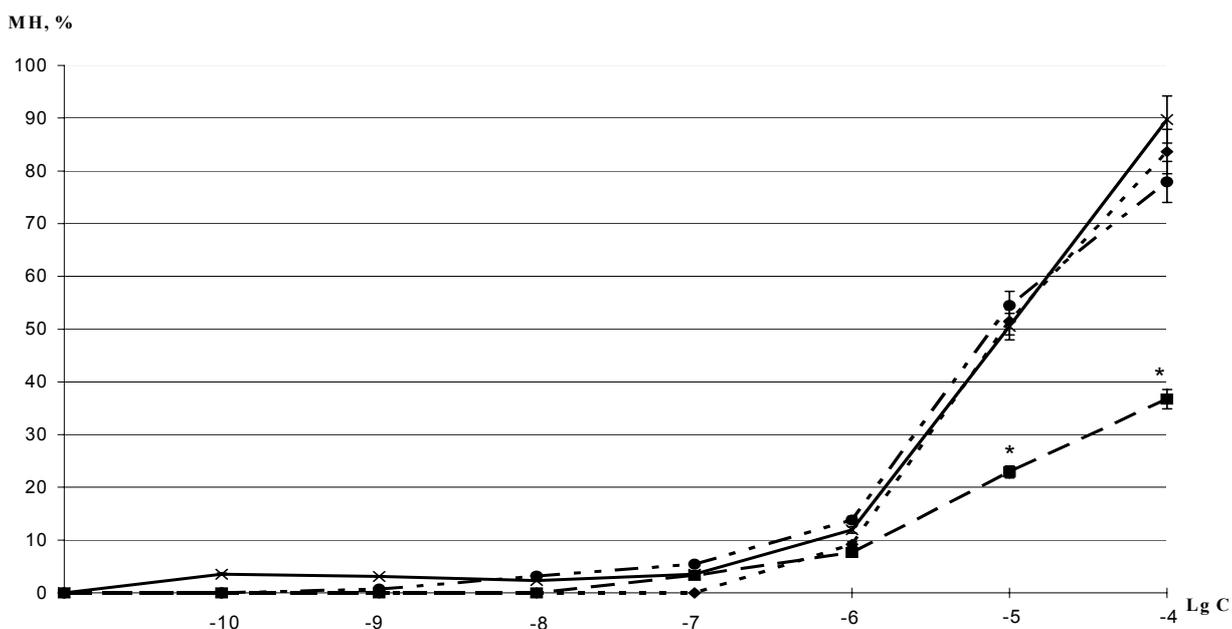


Рис. 30. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина (эпителий удален).

— — сегменты сенсibilизированных морских свинок.

- - ■ - - сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с рецептором ИЛ-5 в концентрации 1 мкг/мл.

- . ● . - сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с рецептором ИЛ-5 в концентрации 0,5 мкг/мл.

.....◆..... - сегменты сенсibilизированных морских свинок, инкубированные с рецептором ИЛ-5 в концентрации 0,1 мкг/мл.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов, инкубированных с рецептором ИЛ-5 и неинкубированных.

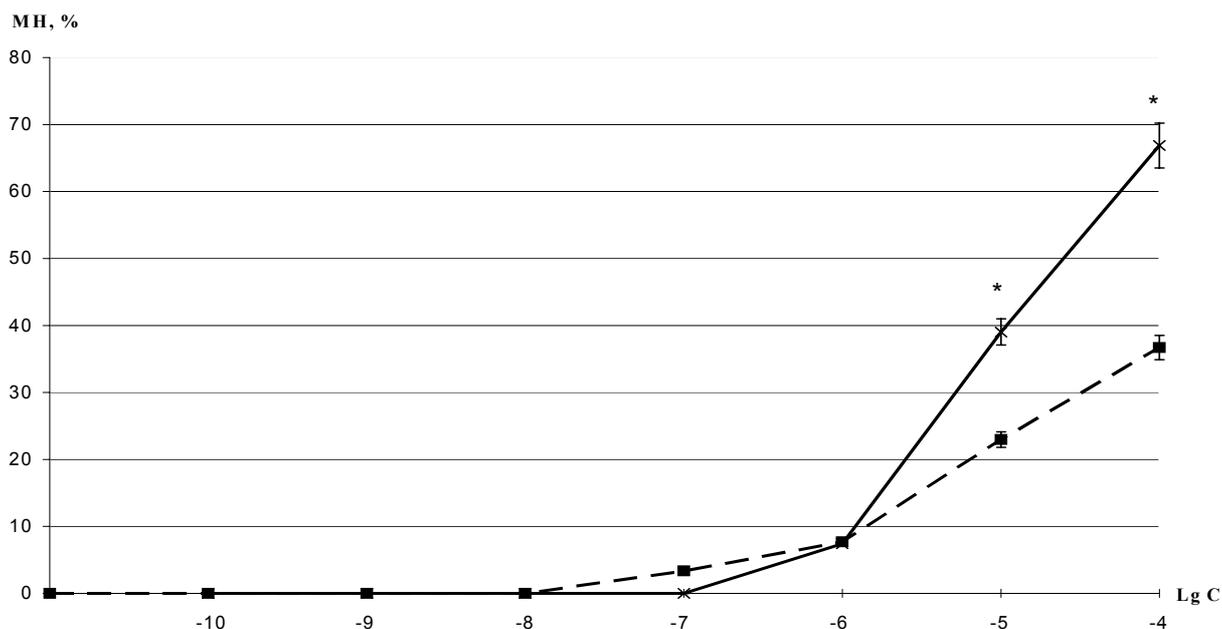


Рис. 31. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок от концентрации гистамина (эпителий удален), инкубированных с рецептором ИЛ-5 в концентрации 1 мкг/мл.

Сплошная линия – сегменты морских свинок контрольной группы.

Пунктирная линия – сегменты сенсibilизированных морских свинок.

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - десятичный логарифм концентрации гистамина (Lg C).

* - достоверность различий в амплитудах сократительных реакций сегментов морских свинок контрольной группы и сенсibilизированных.

3.5. Кинетическая модель сократительных реакций гладких мышц воздухоносных путей

Результаты, приведенные выше, дают качественную оценку влияния медиаторов на сократительные реакции воздухоносных путей. Для количественного описания взаимодействия физиологически активных соединений с рецепторами мембран широко используется кинетическая теория взаимодействия лигандов с рецепторами [24, 36, 42, 68]. Согласно этой теории, биологический эффект, вызываемый в биосистеме каким-либо воздействием, например, физиологически активным соединением, является следствием сложной цепи процессов, где основное звено представлено химическими превращениями специфического структурного элемента системы – рецептора. Кинетическая теория рецепции позволяет проводить количественный анализ регистрируемых при этом кривых “доза-эффект”, отражающих зависимость биологического ответа системы от концентрации (дозы) действующего соединения.

Первая кинетическая модель рецепторного взаимодействия была создана Кларком для описания зависимости амплитуды сокращения мышцы от концентрации добавленного в систему медиатора возбуждения – ацетилхолина [79]. В ее основе лежит обратимая химическая реакция между медиатором возбуждения или в общем случае агонистом (лигандом) и рецептором мышечной мембраны, сопровождающаяся образованием комплекса агонист-рецептор (лиганд-рецептор).

Кинетика взаимодействия медиатора с рецептором описывается уравнением:

$$E = \frac{E_{\max} * c}{c + K} ,$$

где E – эффект медиатора, вызванный концентрацией c (амплитуда реакции),

E_{max} – максимальный ответ,

c – концентрация медиатора, вызывающая ответный эффект E ,

K – константа сродства лиганд-рецепторного комплекса, отражающая степень сродства рецептора к медиатору.

Степень соответствия данного уравнения экспериментальным данным выражается величиной R (R -квадрат ($0 < R\text{-квадрат} < 1$), так называемый квадрат смешанной корреляции (*коэффициент определенности- coefficient of determination* в англоязычной литературе)). Даже если распределение зависимой переменной не является нормальным, этот показатель помогает оценить, насколько хорошо подобранная модель согласуется с исходными данными, при этом соответствие считается достоверным, если $R > 0,99$.

При оценке взаимодействия гистамина с рецепторами деэпителизированных сегментов животных контрольной группы было обнаружено, что для них $E_{max} = 55,21$, $K = 5,61$, $R = 0,9986$ (рис. 32).

При расчете кинетических характеристик для интактных сегментов контрольной группы (с эпителием) были получены следующие значения: $E_{max} = 42,66$, $K = 5,1$ при $R = 0,9988$ (рис. 33).

Максимальная амплитуда реакций на воздействие гистамина у деэпителизированных сегментов контрольной группы оказалась выше, чем у сегментов с эпителием, сродство рецептора к лиганду тоже выше у сегментов без эпителия. Значит, в присутствии эпителия снижается реактивность гладких мышц на воздействие гистамина и уменьшается сродство рецепторов к гистамину.

Для деэпителизированных сегментов сенсibilизированных свинок расчетные характеристики равнялись: $E_{max} = 97,43$, $K = 8,93$ при $R = 0,9974$ (рис. 34).

Сродство рецепторов к гистамину у деэпителизированных сегментов животных экспериментальной группы было выше, чем у сегментов

животных контрольной группы. При этом максимальный эффект экспериментальной группы оказался также на 42 % выше максимального эффекта контрольной группы, что говорит о повышении реактивности сегментов на гистамин при сенсibilизации.

При сохраненном эпителии сегментов сенсibilизированных свинок: $E_{max} = 78,99$, $K = 7,07$ при $R = 0,9991$ (рис. 35). Таким образом, наблюдается снижение как максимальной амплитуды сокращения по сравнению с деэпителизированными сегментами, так и сродства рецептора к лиганду. Видимо, на ранних стадиях сенсibilизации эпителий еще сохраняет свои функции и способен изменять эффект воздействия медиатора на гладкие мышцы ВП.

При инкубации сегментов с ИЛ-5 и максимальный эффект и сродство рецепторов к гистамину увеличиваются в обеих группах, при этом значения этих констант для экспериментальной группы остаются повышенными ($E_{max} = 125,73$, $K = 9,64$ при $R = 0,9976$ (рис. 36) по сравнению с контрольной группой ($E_{max} = 105,79$, $K = 7,85$ при $R = 0,9994$ (рис. 37)).

Значит, при инкубации с ИЛ-5 увеличивается реактивность ГМ на гистамин и его сродство к рецептору в обеих группах, но в экспериментальной группе они остаются выше, чем в контрольной. Это может быть обусловлено начальным (до инкубации) состоянием гладкомышечных сегментов сенсibilизированных животных.

При инкубации сегментов сенсibilизированных животных с α -субъединицей рецептора ИЛ-5 максимальный эффект и сродство рецепторов к гистамину уменьшаются по сравнению с неинкубированными сегментами ($E_{max} = 35,71$, $K = 3,93$, $R = 0,9974$ (рис. 38)), что свидетельствует о способности растворимого рецептора ИЛ-5 снижать реактивность гладких мышц на гистамин.

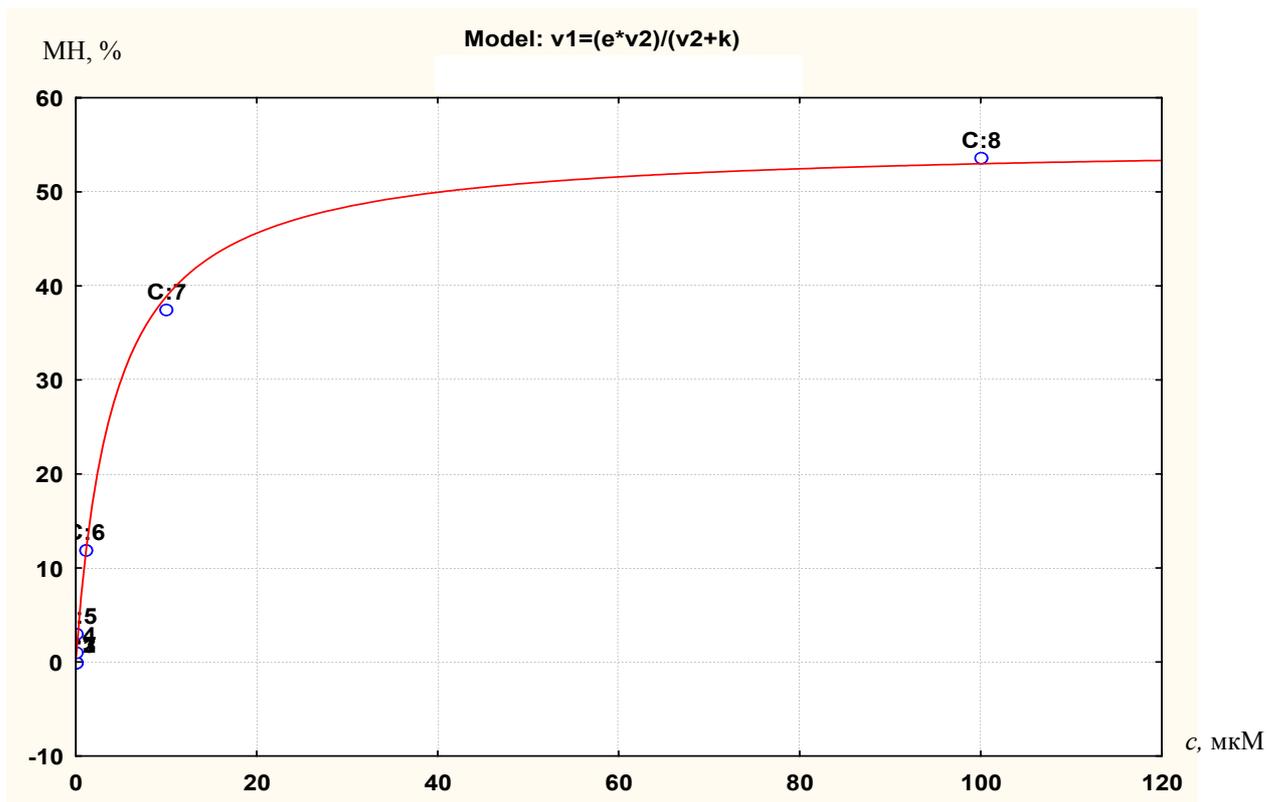


Рис. 32. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы от концентрации гистамина (эпителий удалён) (nonlinear estimation by Rosenbrock and quasi-Newton method).

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - концентрация гистамина в мкМ (c, мкМ).

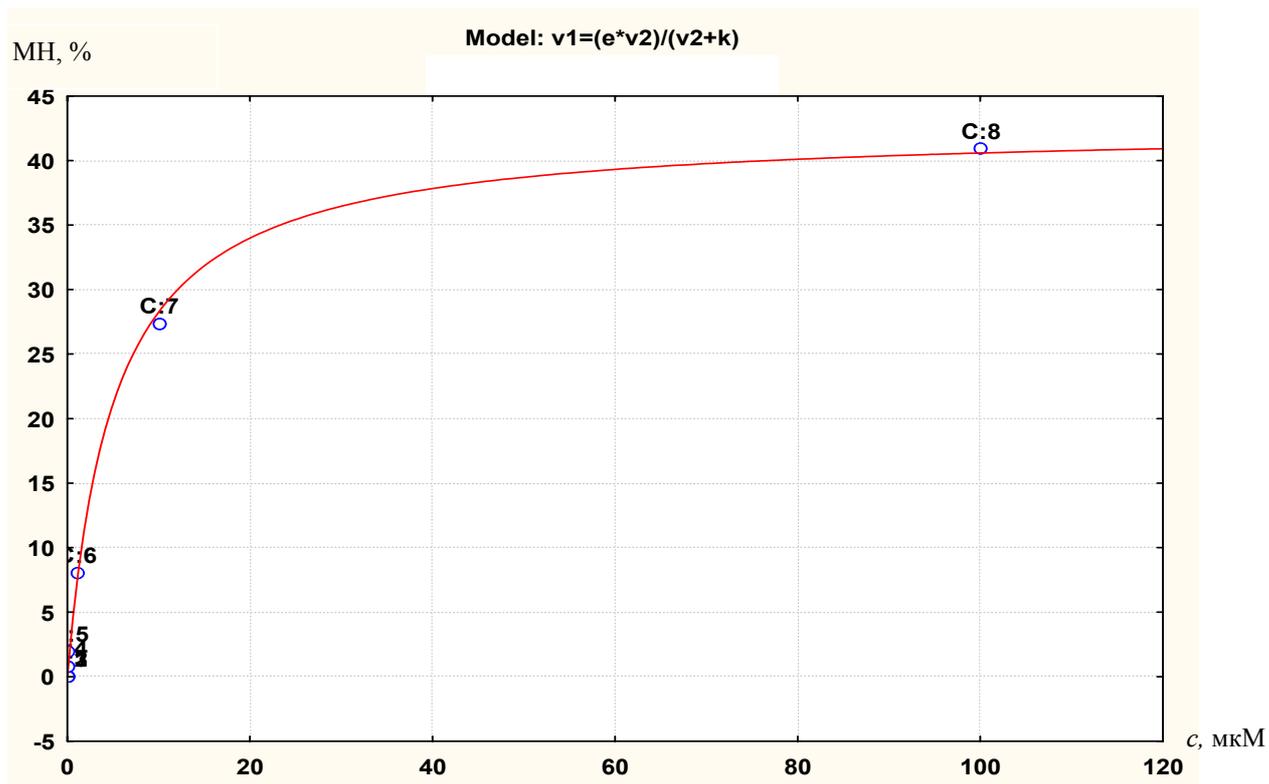


Рис. 33. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы от концентрации гистамина (с эпителием) (nonlinear estimation by Rosenbrock and quasi-Newton method).

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - концентрация гистамина в мкМ (с, мкМ).

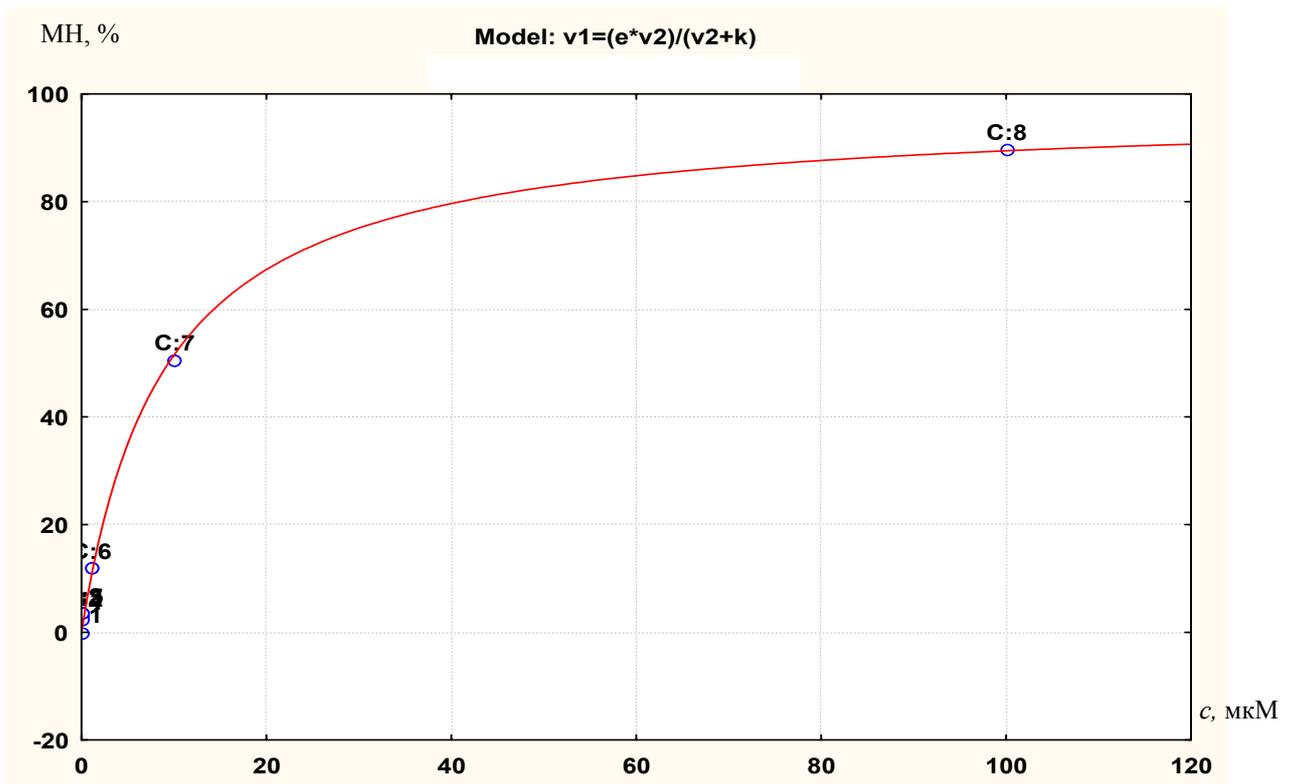


Рис. 34. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов сенсibilизированных морских свинок от концентрации гистамина (эпителий удалён) (nonlinear estimation by Rosenbrock and quasi-Newton method).

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - концентрация гистамина в мкМ (с, мкМ).

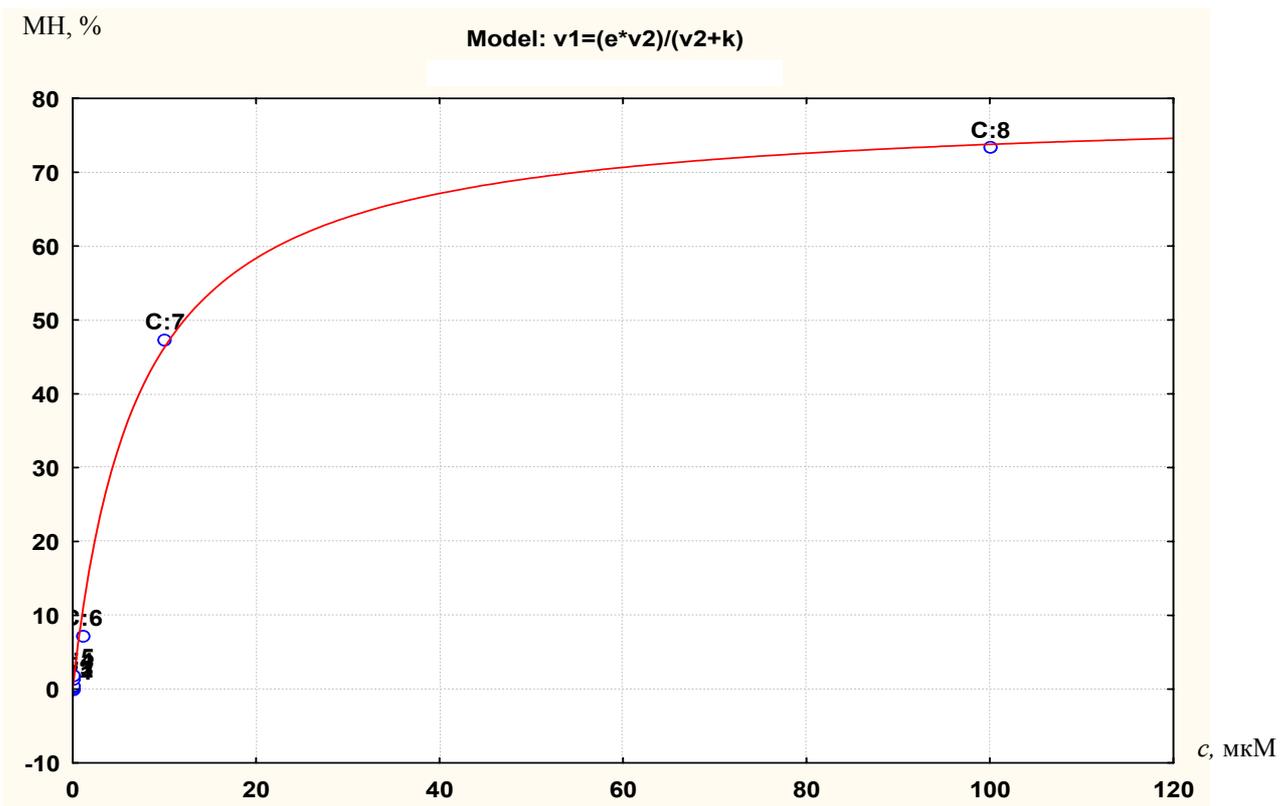


Рис. 35. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов сенсibilизированных морских свинок от концентрации гистамина (с эпителием) (nonlinear estimation by Rosenbrock and quasi-Newton method).

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - концентрация гистамина в мкМ (c, мкМ).

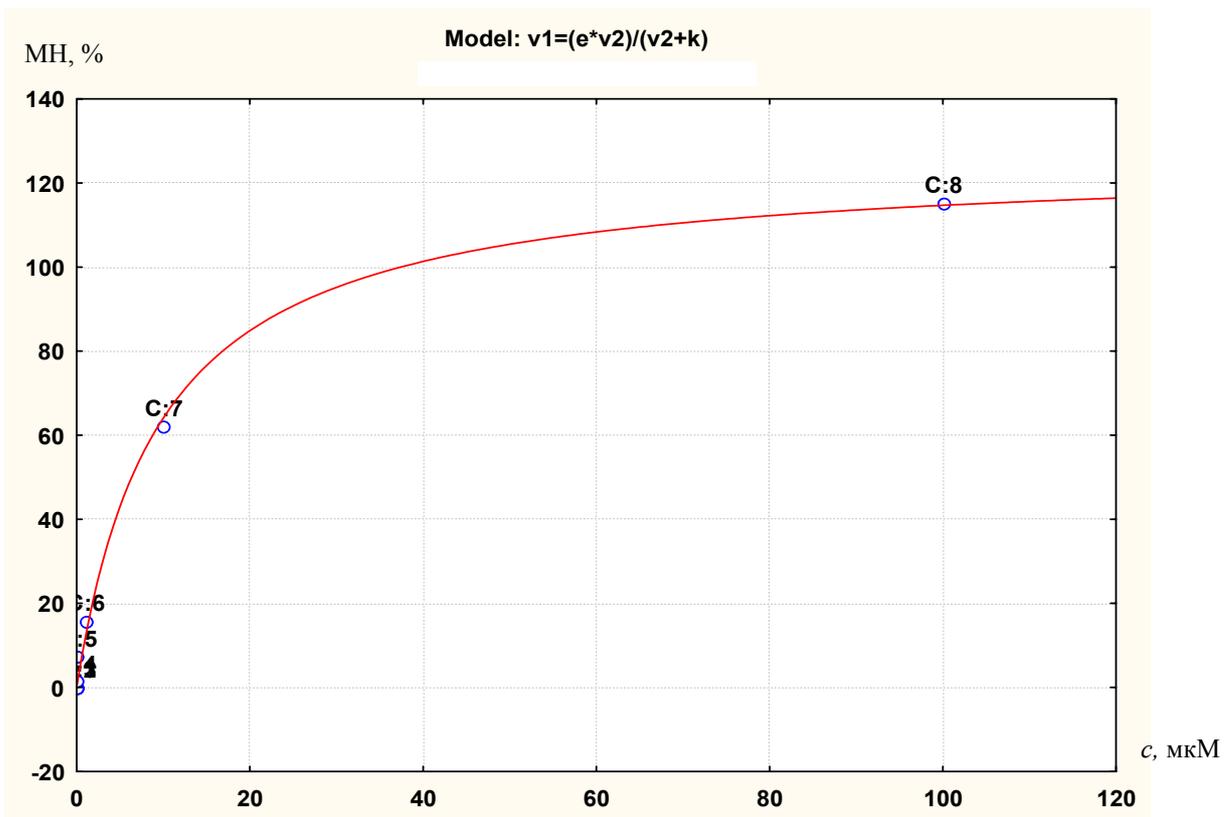


Рис. 36. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов сенсibilизированных морских свинок, инкубированных с ИЛ-5, от концентрации гистамина (эпителий удалён) (nonlinear estimation by Rosenbrock and quasi-Newton method).

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - концентрация гистамина в мкМ (c, мкМ).

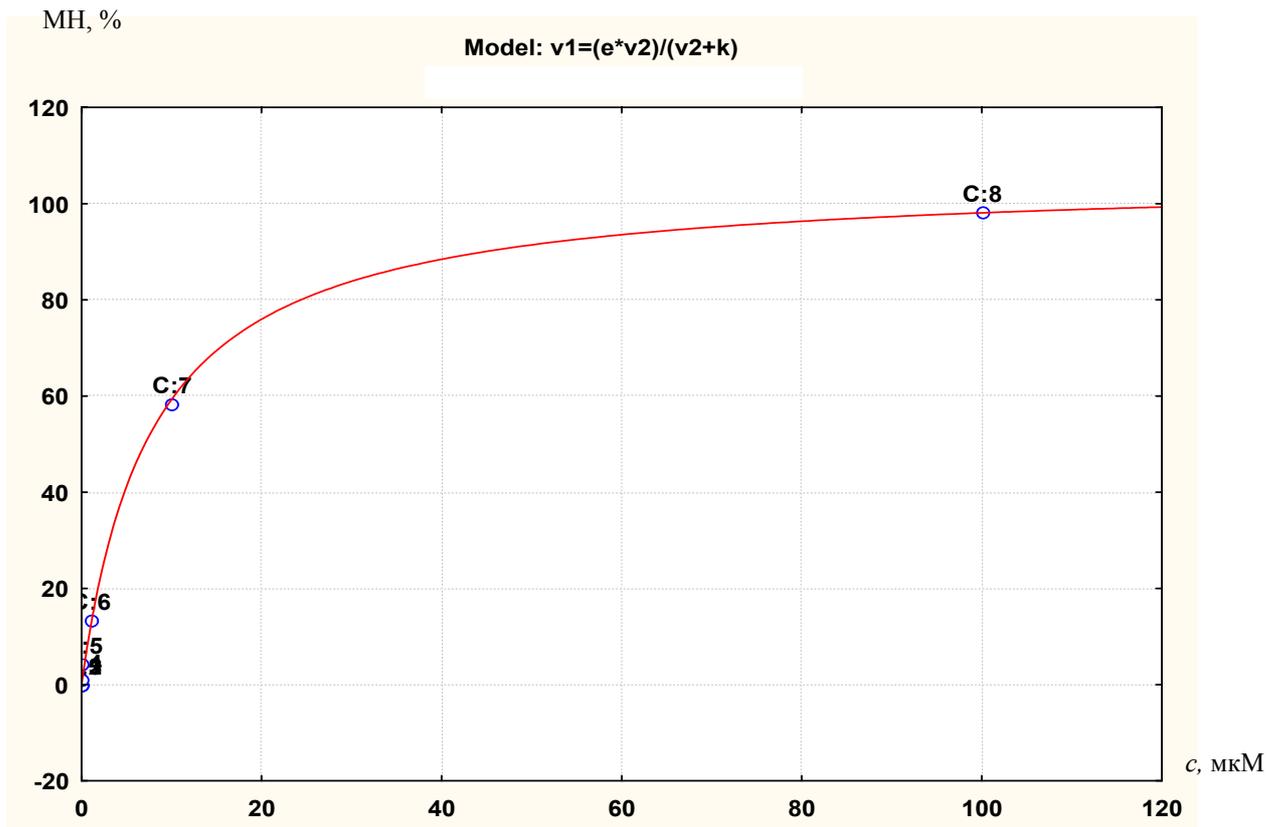


Рис. 37. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов морских свинок контрольной группы, инкубированных с ИЛ-5, от концентрации гистамина (эпителий удалён) (nonlinear estimation by Rosenbrock and quasi-Newton method).

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - концентрация гистамина в мкМ (c, мкМ).

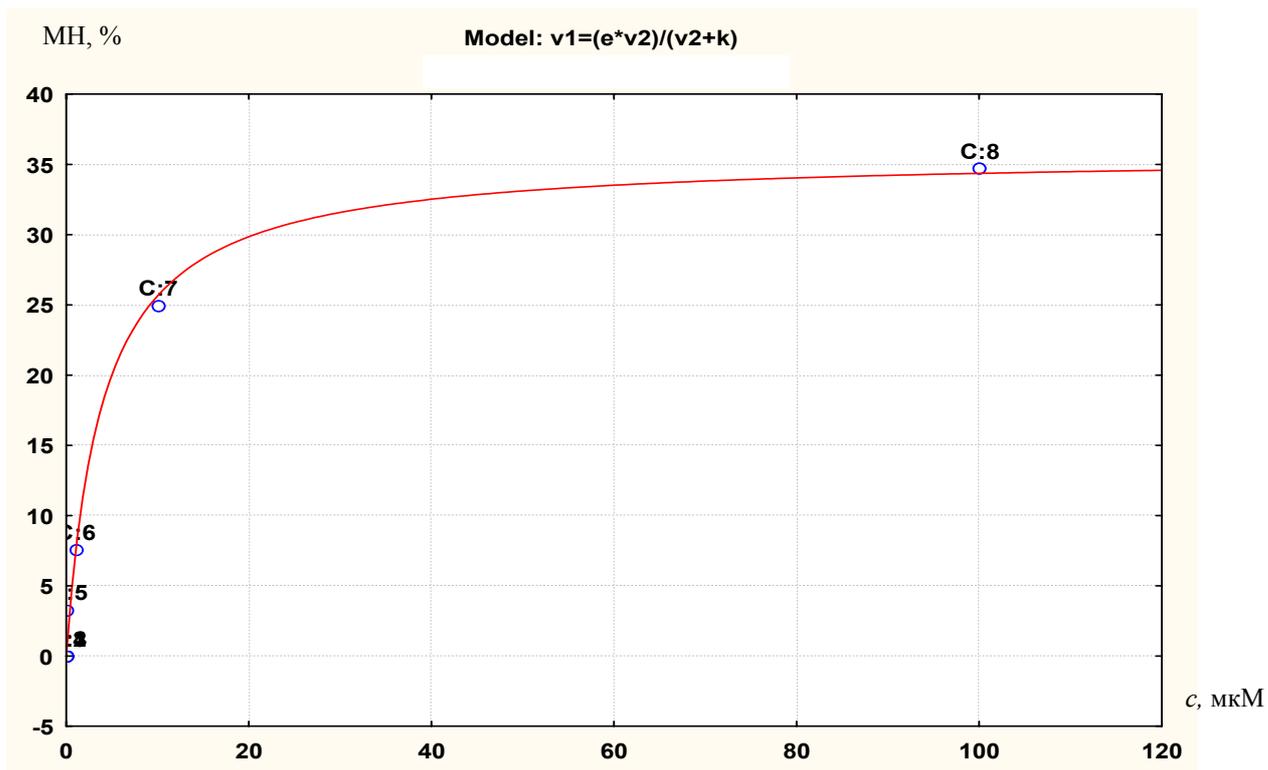


Рис. 38. Зависимость механического напряжения (МН) гладкомышечных сегментов бронхов сенсibilизированных морских свинок, инкубированных с α -субъединицей рецептора ИЛ-5, от концентрации гистамина (эпителий удалён) (nonlinear estimation by Rosenbrock and quasi-Newton method).

По оси ординат – механическое напряжение в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (МН, %).

По оси абсцисс - концентрация гистамина в мкМ (c, мкМ).

Таким образом, реактивность на гистамин и сродство рецепторов к гистамину выше у сегментов экспериментальной группы, чем у сегментов контрольной группы. Для интактных сегментов контрольной группы величина максимального эффекта и сродство рецепторов к лиганду уменьшаются по сравнению с дезэпителизированными сегментами, что говорит о вкладе эпителия в ответные реакции на воздействие гистамина. На ранних стадиях экспериментальной БА эпителий теряет свои функции не полностью, что выражается в уменьшении, хоть и незначительном, максимальной амплитуды сокращения и сродства рецепторов к гистамину по сравнению с сегментами без эпителия.

Инкубация с ИЛ-5 повышает максимальную амплитуду сократительных реакций и сродство рецепторов к действующему медиатору – гистамину, как в контрольной группе, так и в экспериментальной. Сохранение разницы в амплитудах гистаминергических реакций сегментов, инкубированных с ИЛ-5, несенсибилизированных и сенсибилизированных животных свидетельствует о роли начального состояния ГМ в развитии гиперреактивности ВП.

Наоборот, инкубация сегментов животных экспериментальной группы с α -субъединицей рецептора ИЛ-5 снижает величину сократительного ответа на воздействие гистамина и сродство рецепторов к гистамину.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современной физиологии и медицине много внимания уделяется изучению механизмов регуляции электрических и сократительных свойств гладких мышц внутренних органов. Исследование этих свойств помогает раскрыть глубинные механизмы патогенеза заболеваний и разработать новые способы коррекции патологических состояний [9, 31]. Особое значение такие исследования имеют для системы дыхания, так как значительная часть заболеваний респираторной системы связана с нарушением регуляторных механизмов гладкомышечных клеток стенки воздухоносных путей [1, 81, 154].

Перспективным путем выяснения упомянутых механизмов является моделирование дисфункции респираторного тракта у экспериментальных животных [27, 99, 169]. В данном исследовании моделью дисфункции респираторного тракта явились сенсibilизация морских свинок овальбумином и инкубация гладкомышечных сегментов с интерлейкином 5.

Гистологическая картина бронхов у морских свинок после сенсibilизации овальбумином во многом аналогична таковой у людей больных атопической бронхиальной астмой (БА) [16, 37]. Полученные данные позволяют провести определенные параллели между гиперреактивностью воздухоносных путей морских свинок при сенсibilизации овальбумином и гиперреактивностью бронхов у больных бронхиальной астмой.

В основе острых аллергических реакций, например, бронхоспазма, лежит гиперчувствительность немедленного типа. Ее опосредуют биологически активные вещества, которые высвобождаются тучными клетками при взаимодействии аллергена с IgE на поверхности клеток: гистамин, триптаза и др. [54]. При БА в бронхах повышена экспрессия рецепторов гистамина первого типа [148]. Выявленное в данной работе увеличение максимальной амплитуды сокращения сегментов

сенситизированных животных может свидетельствовать об увеличении в них количества рецепторов к гистамину. Это может объяснить более выраженное действие гистамина на гладкие мышцы бронхов, полученных от животных экспериментальной группы.

Увеличение амплитуды сократительных реакций изолированных гладких мышц воздухоносных путей на холинергические воздействия при сенситизации может также объясняться повышением количества M_3 -холинорецепторов [169], стимуляция которых ведет к входу Ca^{2+} в клетку и развитию сокращения.

Уменьшение степени расслабления гладкомышечных сегментов сенситизированных животных при действии β_2 -адреномиметика, вероятно, связано с уменьшением количества β_2 -адренорецепторов [133].

Было выявлено, что функции эпителия интактных животных при адренергических воздействиях зависят от предсокращающего фактора. Если предсокращение проводится гиперкалиевым раствором Кребса, то эпителий снижает степень расслабления, по-видимому, выделяя констрикторные факторы, на роль которых претендуют ацетилхолин, простаноиды и пептидсодержащие лейкотриены C_4 и E_4 [130, 135]. При предсокращении гистамином эпителий вовлекается в реакции расслабления, усиливая их, видимо, выделяя релаксирующий фактор, возможно, NO [91]. При гистаминергических воздействиях эпителий интактных морских свинок снижает амплитуду контрактильных реакций, а при холинергических воздействиях – повышает ее.

При сенситизации происходит нарушение целостности эпителиального пласта, возникают необратимые органические изменения стенки воздухоносных путей, это ведет к дефициту нитроксида азота, бронхорелаксации, потере эпителием эндокринных функций [48, 75], потерей эпителием эндокринных функций [75, 189]. Эпителий утрачивает

способность модулировать ответные реакции гладких мышц на различные воздействия. Таким образом, это может быть причиной отсутствия различий между сократительными реакциями сегментов с эпителием и без эпителия у сенсibilизированных морских свинок.

Выявленное увеличение сократительных реакций гладких мышц бронхов на воздействие гистамина у животных обеих групп при инкубации сегментов с ИЛ-5 может развиваться за счет взаимодействия данного интерлейкина со своими рецепторами в гладкомышечных клетках. ИЛ-5 - индуцированное развитие гиперреактивности гладких мышц бронхов может играть определенную роль в механизмах развития бронхиальной астмы. При этом инкубация гладкомышечных сегментов с данным цитокином, возможно, посредством тех же механизмов подавляет дилатационные реакции на сальбутамол, что может обуславливать снижение чувствительности воздухоносных путей к катехоламинам при БА.

Наблюдаемое уменьшение сократительных реакций гладкомышечных сегментов при их инкубации с рецептором ИЛ-5 может свидетельствовать о способности растворимого рецептора связывать как экзогенный интерлейкин, добавленный в среду при инкубации, так и эндогенный, продуцируемый клеточными элементами стенки воздухоносных путей сенсibilизированных животных.

Полученные результаты, на наш взгляд, позволяют обсудить перспективу использования растворимой формы α -субъединицы рецептора ИЛ-5 для блокирования действия этого интерлейкина на клетки, устраняя эффекты, опосредованные им. Такой подход может лечь в основу принципиально нового, патогенетически обоснованного способа коррекции бронхоспастических состояний.

Выявленные кинетические характеристики показали, что, реактивность на гистамин и сродство рецепторов к гистамину выше у сегментов экспериментальной группы, чем у сегментов контрольной группы. При удалении эпителия увеличивается максимальный эффект и сродство

рецептора к медиатору в обеих группах животных.

Инкубация с ИЛ-5 повышает максимальную амплитуду сократительных реакций и сродство рецепторов к действующему медиатору – гистамину, как в контрольной группе, так и в экспериментальной. При инкубировании сегментов животных экспериментальной группы с α -субъединицей рецептора ИЛ-5 снижаются сократительные реакции на воздействие гистамина и сродство рецепторов к гистамину.

ВЫВОДЫ

1. Сенсibilизация овалбумином морских свинок приводит к формированию гиперреактивности воздухоносных путей, которая проявляется в увеличении амплитуды сократительных реакций на холинэргические и гистаминэргические воздействия.

2. Характер адренэргических сократительных реакций сегментов воздухоносных путей сенсibilизированных животных зависит от предсокращающего фактора: в условиях предсокращения гистамином адренэргическая реактивность не изменялась, а предсокращение гиперкалиевым раствором Кребса угнетало адренэргическое расслабление сегментов.

3. Респираторный эпителий угнетает сократительные реакции сегментов воздухоносных путей интактных животных на гистаминэргические воздействия, потенцирует сократительные реакции на холинэргические воздействия. Влияние эпителия на адренэргические реакции зависит от предсокращающего фактора: они потенцировались при предсокращении гистамином и угнетались при предсокращении гиперкалиевым раствором Кребса. В условиях формирования гиперреактивности эпителий утрачивает способность модулировать ответные реакции гладких мышц воздухоносных путей.

4. Инкубация гладкомышечных сегментов воздухоносных путей с интерлейкином 5 потенцирует сократительные реакции на гистаминэргические воздействия, уменьшает степень расслабления на адренэргические воздействия как у интактных, так и у сенсibilизированных животных. Рекомбинантный рецептор интерлейкина 5 (растворимая фракция) дозозависимо нейтрализует эффект экзогенного интерлейкина 5, а инкубация с рецептором сегментов сенсibilизированных (но не интактных) животных угнетает гистаминэргические сократительные реакции.

5. Кинетические параметры сократительных реакций гладких мышц бронхов, моделируемые на основе системы уравнений обратимой химической реакции между лигандом и мембранным рецептором, изменяются в условиях формирования гиперреактивности воздухоносных путей: максимальная амплитуда ответа и сродство рецепторов к гистамину увеличиваются после удаления респираторного эпителия, в условиях формирования сенсibilизации при условии сохранности эпителиального слоя и при инкубации с интерлейкином 5; и снижаются при инкубации сегментов сенсibilизированных животных с α -субъединицей рецептора интерлейкина 5.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абросимов В.Н. Нарушения регуляции дыхания / В.Н. Абросимов. - М., Медицина. - 1990. - 245 с.
2. Абуева Р.М. Функциональное состояние холинэргических и адренергических рецепторов у лиц с преастмой и факторами риска развития бронхиальной астмы: Дисс. ... канд. мед. наук / Р.М. Абуева. - М., 1989. - 133 с.
3. Анатомия человека: В 2 т. / Под ред. М.Р. Сапина. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1993. – 544 с.: ил. - Т. 1.
4. Анфиногенова Я.Д. Особенности эпителий-зависимых сократительных реакций гладких мышц в различных отделах респираторного тракта: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Я.Д. Анфиногенова. – Томск, 1997. – 21 с.
5. Арбузов Е.Н. Клиническая характеристика больных бронхиальной астмой, осложненной развитием астматического состояния / Е.Н. Арбузов, Д.А. Поташов // Патогенез, клиника и терапия экстрем. и терминальн. состояний / Омск. гос. мед. Ин-т. - Омск, 1994. - С. 120 - 122.
6. Базанов Г.А. Некоторые показатели крови кроликов при сенсibilизации / Г.А. Базанов, В.В. Смирнов, Т.Д. Табакова // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 17-18.
7. Баскаков М.Б. Кальмодулин в механизмах регуляции сократительной функции гладкой мускулатуры / М.Б. Баскаков, М.А. Медведев.// Бюлл. СО РАМН. - 1984. - № 4. - С. 83 - 88.
8. Баскаков М.Б. Механизмы регуляции функций гладких мышц вторичными посредниками / М.Б. Баскаков, М.А. Медведев, Л.В. Капилевич и др. - Томск, 1996.-154с.
9. Баскаков М.Б. Роль вторичных мессенджеров и Na/H-обмена в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц / М.Б. Баскаков, М.А. Медведев // Томск, 1987. - С. 128 - 151.

10. Башмаков Ю.К. Общее содержание фосфолипидов в тканях и крови при сенсibilизации / Ю.К. Башмаков // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 15-16.
11. Башмаков Ю.К. Показатели обмена общих липидов при сенсibilизации / Ю.К. Башмаков, И.В. Головацкий // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 14-15.
12. Бойков А.К. Ультраструктура компонентов эпителия трахеобронхиального дерева / А.К. Бойков, С.П. Бойкова, Л.Б. Тарасова // Архив патологии. – 1989. - Т. 51, № 2, С. 85 - 89.
13. Бронхиальная астма. Сборник научных трудов / Под ред. Г.Б. Федосеева. – М.: Медицина. – 1989. – 125 с.
14. Брусиловский Е.С. Экспериментальное воспроизведение бронхиальной астмы с применением пневмоцитотоксической сыворотки / Е.С. Брусиловский // Цитотоксины в современной медицине. - Киев, 1966. – С. 155 – 162.
15. Бурый А.А. Содержание глутатиона в ткани легких в кинетике сенсibilизации / А.А. Бурый // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 10-11.
16. Васильев П.Н. К морфологии дыхательных путей при бронхиальной астме / П.Н. Васильев, В.П. Быкова, В.П. Довжик и др. //Архив патологии. - 1974. - Т.XXXVI, вып. 2.-С. 22 - 25.
17. Волков В.Т. Бронхиальная астма / В.Т. Волков, А.К. Стрелис. – Томск, - 1996. – 568 с.
18. Волхонская Т.Б. Выбор метода эфферентной терапии в лечении больных бронхиальной астмой / Т.Б. Волхонская, М.А. Колпаков // Бюллетень сибирского отделения РАМН. – 2000. - №2. - С. 45-48.
19. Воробьева Т.В. Исследование бронхоспазмолитической эффективности препарата Витурид в условиях аллергического бронхоспазма / Т.В. Воробьева // Астма. - 2003. Т.4, №1. – С. 68.

20. Гаврилова Е.В. Реакция гладкомышечного препарата трахеи морской свинки на гистамин / Е.В. Гаврилова, А.Н. Федин, И.К. Шопотов // Биохим. и биофиз. механизмы физиологических функций: Матер. конфер. молек. физиологов и биохимиков России, [Санкт-Петербург, 1995]. - СПб, 1995. - С. 39.
21. Галактионов В.Г. Иммунология: Учеб. для вузов / В.Г. Галактионов.- М.: МГУ, 1998.- 480с.
22. Герасин В.А. Бронхофиброскопическая оценка воспалительных изменений и гиперреактивности бронхов у больных бронхиальной астмой / В.А. Герасин, Г.Ф. Паламарчук, А.П. Кизела // Терапевт. архив. – 1994. – С. 15-19.
23. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. / С. Гланц // М.: "Практика", 1999. - 459 с.
24. Говырин В.А. Лиганд-рецепторные взаимодействия в молекулярной физиологии / В.А. Говырин, Б.С. Жоров. - СПб.: Наука, 1994. - 240с.
25. Григорян Л.Т. Содержание 6-кето-ПГ F₁ф, тромбоксана и ПГ F₂ф в крови больных бронхиальной астмой / Л.Т. Григорян, Т.А. Червинская // Клинич. медицина. - 1993. – Т. 71, № 5. - С. 24 - 27.
26. Дьячук Г.И. Возможные пути регуляции кальциевого обмена / Г.И. Дьячук // Физиол.журн.СССР.- 1991.- Т.77, № 11.- С. 117-125.
27. Елисеева Е.В. Реакция нитроксидсинтазы и тучных клеток органов дыхания при действии адренергических веществ при бронхиальной астме: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е.В. Елисеева. - Владивосток, 1997. – 26 с.
28. Зашихин А.Л. Развитие и ультраструктура нейромышечных контактов гладкой мышечной ткани бронхов / А.Л. Зашихин// Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1989, Т. 97, № 7. – С. 58 – 63.
29. Иммунология: В 3 т. / Под ред. У. Пол. – М.: Мир. – 1989. – Т. 2. – 362 с.

30. Капилевич Л.В. Механизмы, обеспечивающие резистентность гладких мышц трахеи крысы к гистамину / Л.В. Капилевич, М.Б. Баскаков, М.А. Медведев и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1995. - № 9. - С. 283 - 285.
31. Капилевич Л.В. Эпителий-зависимая регуляция тонуса бронхов / Л.В. Капилевич, М.Б. Баскаков, М.А. Медведев и др. // Матер. Всерос. конф., Сыктывкар, 6 - 8 июля 1994. - Сыктывкар, 1994. - С. 82 - 85.
32. Ковалишин В.И. Электронномикроскопическое исследование кожи при модели бронхиальной астмы / В.И. Ковалишин, В.А. Иванцов, Л.В. Ющик // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 28-29.
33. Крутецкая З.И. Метаболизм фосфоинозитидов и формирование кальциевого сигнала в клетках / З.И. Крутецкая, О.Е. Лебедев // Цитология. - 1992. - Т. 34, № 10. - С. 26 – 45.
34. Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны / Д.О. Левицкий - М.: Высш. школа, 1990. - 124 с.
35. Митина Т.В. Показатели основного обмена при модели бронхиальной астмы и ее терапии церулоплазмином / Т.В. Митина, М.С. Регеда // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 35-36.
36. Михельсон М.Я. Ацетилхолин. О молекулярном механизме действия / М.Я. Михельсон, Э.В. Зеймаль. - Л.: Наука, 1970. - 279с.
37. Непомнящих Г.И. Морфогенез и прижизненная патоморфологическая диагностика хронических патологических процессов в легких / Г.И. Непомнящих, Л.М. Непомнящих // Пульмонология. – 1997. – № 2. – С. 7 – 16.
38. Непомнящих Г.И. Патологическая анатомия и ультраструктура бронхов при хронических воспалительных заболеваниях легких / Г.И. Непомнящих. – Новосибирск: Наука. – 1980. – 292 с.

39. Орлов С.Н. Кальмодулин / С.Н. Орлов // Итоги науки и техники. - М., 1987. - 209 с.
40. Орлов С.Н. Са-насос плазматической мембраны / С.Н. Орлов // Кальций - регулятор метаболизма. - Томск, 1987. - С. 74 - 96.
41. Орлов С.Н. Участие кальмодулина в регуляции электрического потенциала плазматической мембраны внутриклеточным кальцием / С.Н. Орлов, Г.М. Кравцов // Биохимия. - 1983. - Т. 48, № 9. - С. 1447 – 1455.
42. Полтораков А.П. Кинетические модели одиночного мышечного сокращения / А.П. Полтораков, В.М. Чибрикин, Л.А. Пирузян // Биофизика. - 1978. - Т. 23, № 1. - С. 105–109.
43. Пузырев В.П. Наследуемость уровня общего интерлейкина-5 и полиморфизм С-703Т гена IL-5 у больных бронхиальной астмой / В.П. Пузырев, М.Б. Фрейдин, Л.М. Огородова, О.С. Кобякова // Бюл. эксп. биол. и мед. Приложение 1. – 2000. – С.-50-52.
44. Расмуссен Г. Циркуляция кальция и внутриклеточная передача сигнала / Г. Расмуссен // В мире науки. - 1989. - № 12. - С. 36 - 43.
45. Регеда М.С. Влияние церулоплазмينا на содержание в крови катехоламинов при модельном процессе бронхиальной астмы / М.С. Регеда // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 36.
46. Реутов В.П. Физиологическое значение гуанилатциклазы и роль окиси азота и нитросоединений в регуляции активности этого фермента / В.П. Реутов, С.Н. Орлов // Физиология человека. - 1993. - Т. 19, N 1. - С. 124 - 137.
47. Саркисов Д.С. Воспроизведение болезней человека в эксперименте / Д.С. Саркисов, П.И. Ремезов. - Москва, – 1960. – 780 с.
48. Сепиашвили Р.И. Роль оксида азота при бронхиальной астме / Р.И. Сепиашвили, М.Г. Шубич, В.Б. Карпюк // Астма. – 2003. - Т. 4, № 1. – С. 39.
49. Сергеев П.В. Рецепторы физиологически активных веществ / П.В. Сергеев, Н.Л. Шимановский - М.: Медицина. - 1987. - 400 с.

50. Синопальников А.И. β_2 -агонисты: роль и место в лечении бронхиальной астмы / А.И. Синопальников, И.Л. Клячкина // Русский мед. журнал. – 2002. – Т. 10, № 5 (149). – С. 236 – 241.
51. Скок В.И., Шуба М.Ф. Нервномышечная физиология. - Л., 1986.- 224с.
52. Соловьев А.И. цАМФ-зависимый механизм расслабления сосудистых гладких мышц при гипоксии, не связанной со снижением концентрации Ca^{2+} в миоплазме / А.И. Соловьев // Докл. АН СССР. - 1985. - Т. 285, №5. - С. 1252 - 1255.
53. Тепперман Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы: Пер. с англ. / Дж. Тепперман, Х. Тепперман.- М.: Мир, 1989. - 656 с.
54. Тузлукова Е.Б. Антигистаминные препараты / Е.Б. Тузлукова, Н.И. Ильина, Л.В. Лусс // Русский мед. журнал. – 2002. – Т. 10, № 5 (149). – С. 269 – 272.
55. Федин А.Н. Действие адренергических веществ на гладкие мышцы трахеи крысы / А.Н. Федин, А. Д. Ноздрачев, Г. И. Рыбаков и др. // Физиол. ж.. - 1993. – Т. 79, № 11. - С. 59 - 63.
56. Ходоров Б.И. Роль хемовозбудимых кальциевых каналов в механизмах действия ацетилхолина, гистамина и брадикинина на деполяризованную гладкую мышцу / Б.И. Ходоров, Е.Н. Тимин, В. И. Погодаев // Физиология и биохимия медиаторных процессов. - М., 1976. - С. 133 - 134.
57. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма и астмоподобные состояния / А.Г. Чучалин // Русский медицинский журнал. – 2002. - Т. 10, №5(149). - С 232-235.
58. Чучалин А.Г. Гиперреактивность при заболеваниях органов дыхания / А.Г. Чучалин // Российский медицинский журнал. - 2002.- Т.10, №23. – С. 5 – 10.

59. Шуба М. Ф. Механизмы возбуждения и сокращения гладких мышц мозговых сосудов / М.Ф. Шуба, Н. И. Гокина. - Киев: Наукова думка, 1991. – 129 с.
60. Шуба М.Ф. Мембранные механизмы возбуждения гладкомышечных клеток / М.Ф. Шуба, В.А. Бурый // Физиол.журн. - 1984. - Т. 30, № 5. - С. 545 - 559.
61. Ющик Л.В. Активность некоторых ферментов кожи морских свинок при модельном процессе бронхиальной астмы / Л.В. Ющик // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 27-28.
62. Ющик Л.В. Активность некоторых ферментов ткани легких морских свинок при модельном процессе бронхиальной астмы / Л.В. Ющик // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. – С. 26 – 27.
63. Ющик Л.В. Активность ферментов в ткани гипоталамуса и надпочечников при модельном процессе бронхиальной астмы / Л.В. Ющик, В.А. Иванцов, С.Е. Холин // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 31-32.
64. Ющик Л.В. Некоторые показатели функционального состояния кожи при модельном процессе бронхиальной астмы / Л.В. Ющик // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 25-26.
65. Ющик Л.В. Ферментативная активность сыворотки крови морских свинок при модельном процессе бронхиальной астмы / Л.В. Ющик // Проблемы патологии в эксперименте и клинике. - Львов, 1986. - С. 30-31.
66. Algara-Suarez P. 8Br-cGMP mediates relaxation of tracheal smooth muscle through PKA / P. Algara-Suarez, R. Espinosa-Tanguma // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – Vol. 6, N 2. – P. 597 - 601.
67. Alioua A. PKG-1 phosphorylates the α -subunit and upregulates reconstituted GK Ca channels from tracheal smooth muscle / A. Alioua, J.P. Huggins, E. Rousseau // Amer. J. Physiol. - 1995. - 268, № 6, - P. 1057 - 1063.

68. Ariense E.J. Molecular pharmacology: the mode of action of biologically active compounds / E.J. Ariense Vol. 1, N.Y.-L., 1964. - 503 p.
69. Azuma C. Cloning of cDNA for human T cell replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue / C. Azuma // *Nucleic Acids Research*. - 1986. – N 14. – P. 9149-9158.
70. Barnes P.J. Beta-adrenergic receptors and their regulation / P.J. Barnes // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1995. – Vol. 152. – P. 838 – 860.
71. Bi Y. Correlation of eosinophil apoptosis with interleukin 5 mRNA expression in lung tissues of asthmatic guinea pigs / Y. Bi, Z. Yang, C. Wang // *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. – 1999. - N 4. – P. 228-230.
72. Black J. The calcium dependents of histamine, carbochol and potassium chloride - induced contraction in human airways in vitro / J. Black, C. Armound, P. Jonson et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1986. - V. 25. - P. 159 - 168.
73. Bowerfind W.M. Double-stranded RNA causes airway hyperreactivity and neuronal M2 muscarinic receptor dysfunction / W.M. Bowerfind, A.D. Fryer, D.B. Jacoby // *J. Appl. Physiol.* – 2002. – Vol. 92, N 4.- P. 1417 – 1422.
74. Brottman G.M. Effect of eosinophil peroxidase on airway epithelial permeability in the guinea pig / G.M. Brottman, W.E. Regelman, A. Slungaard et al. // *Pediatr. Pulmonol.* – 1996. – Vol. 21, N 3. – P. 159-166.
75. Busse W.W. Eosinophils in asthma / W.W. Busse, J.B. Sedgwick // *Ann. Allergy*. – 1992. - P. 286-290.
76. Cakici J. Epithelium dependent responses of serotonin in coaxial bioassay system / J. Cakici, B. Tunctan, N.Abacioglu et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1993. - V. 236, N 1. - P. 97 - 105.
77. Chandrasekharappa S.C. A long-range restriction map of the interleukin-4 and interleukin-5 linkage group on chromosome 5 / S.C. Chandrasekharappa // *Genomics*. - 1990. – N 6. – P. 94-99.
78. Cheung W.J. Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity / W.J. Cheung // *Federat. Proc.* - 1984. - V. 4. - P. 2995 - 2999.

79. Clark A.J. The reaction between acetylcholine and atropine / A.J. Clark // *J. Physiol. (London)*. - 1926. - Vol. 61. - P. 530–546.
80. Coeffier E. Role of IL-5 in enhanced migration of eosinophils from airways of immunized guinea pigs / E. Coeffier, D. Joseph, B.B.Vargaftig // *Br. J. Pharmacol.* - 1994. - Vol. 113. - P. 749-756.
81. Cohn L.A. Interactions between airway epithelium and mediators of inflammation / L.A. Cohn, K.B. Adler // *Exp. Lung. Res.* - 1992. - Vol. 18, N 3. - P. 299 – 322.
82. Corrigan C.J. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma / C.J. Corrigan, A.B. Kay // *Immunol. Today*. – 1992. - P. 501-507.
83. Croxton T.L. Expression of dihydropyridine resistance differs in porcine bronchial and tracheal smooth muscles / T.L. Croxton, C. Fleming, C.A. Hirshman // *Amer. J. Physiol.* - 1994. – Vol. 267, N 2, Pt 1. - P. 106 - 112.
84. Daffoncio L. b-adrenoceptor reactivity after epithelium removal in guinea pig trachea in vitro / L. Daffoncio, A. Hernandez, E. Martinotti, C. Omini // *Pharmac. Res.* - 1990. - V. 22, № 1, - P. 49.
85. Dent L.A. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5 / L.A. Dent // *Journal of Experimental Medicine*. - 1990. - N 172. - P. 1425-1431.
86. Devos R. Amino acid sequence analysis of a mouse interleukin 5 receptor protein reveals homology with a mouse interleukin 3 receptor protein / R. Devos // *European Journal of Immunology*. – 1991. - N 21. – P. 1315-1317.
87. Diego A. H-7, a protein kinase inhibitor, inhibits spontaneous tone and spasmogenic responses in normal and sensitized guinea pig trachea / A. Diego, J. Cortijo, V. Villagrasa et al. // *Gen. Pharmacol.* - 1995. – Vol. 26, N 8. - P. 1747 - 1755.
88. Downes H. Comparison of drug responses in vivo and in vitro in airways of dogs with and without airway hyperresponsiveness / H. Downes // *J. Pharmacol. exp. Ther.* - 1986. - Vol. 237, N 1. - P. 214 - 219.
89. Egan R.W. Effect of Sch 55700, a humanized monoclonal antibody to human interleukin-5, on eosinophilic responses and bronchial hyperreactivity /

R.W. Egan, D. Athwal, M.W. Bodmer, et al. // *Arzneimittelforschung*. – 1999. - P. 85 - 90.

90. Elbon C.L. Pretreatment with an antibody to interleukin-5 prevents loss of pulmonary M2 muscarinic receptor function in antigen-challenged guinea pigs // C.L. Elbon, D.B. Jacoby, A.D. Fryer // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1995. - Vol. 12, N 3. - P. 320-328.

91. Ellis J.L. L-citrulline reverses the inhibition of nonadrenergic, noncholinergic relaxations produced by nitric oxide synthase inhibitors in guinea pig trachea and human bronchus / J.L. Ellis, N. Conanan // *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* - 1994. - N 3. - P. 1073 - 1078.

92. Fahy J.V. Airway inflammation and remodeling in asthma / J.V. Fahy, D.B. Corry, H.A. Boushey // *Curr. Opin Pulm. Med.* – 2000. – N 6. – P. 15 – 20.

93. Fahy J.V. Remodeling of the airway epithelium in asthma / J.V. Fahy // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2001. – N 15. – P. 46 – 51.

94. Foster P.S. IL-5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model / P.S. Foster, S.P. Hogan, A.J. Ramsay et al. // *J. Exp. Med.*-1996.-Vol. 183. - P. 195 – 201.

95. Gan L.L. Trachea relaxing effects and beta2-selectivity of SPFF, a newly developed bronchodilating agent, in guinea pigs and rabbits / L.L. Gan, M.W. Wang, M.S. Cheng // *Biol. Pharm. Bull.* – 2003. – N 3. – P. 323 – 328.

96. Gao J. Productors of cyclooxygenase mediate the responses of the guinea pig trachea to hydrogen peroxide / J. Gao, P.M. Vanhoutt // *J. Appl. Physiol.* - 1993. - Vol. 74, N 5. - P. 2105 - 2111.

97. Gosal D. Nitric oxide synthase isoforms and peripheral chemoreceptor stimulation in conscious rats / D. Gosal, E. Gosal, Y.M. Gosal et al. // *NeuroReport*. - 1996. – Vol. 7, N 6. - P. 1145 - 1148.

98. Greenfeder S. Th2 cytokines and asthma—the role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease / S. Greenfeder, S.P. Umland, F.M. Cuss et al. // *Respir. Res.* - 2001. - P. 71 -79.

99. Gulbenkian A.R. IL-5 medulates eosinophil accumulation in allergic guinea pig lung / A.R. Gulbenkian, R.W. Egan, X. Fernander et al. // *Am. Rev. Respir. Dis.*-1992.-Vol.146. - P. 263 - 266.
100. Haczku A. CD23 exhibits negative regulatory effects on allergic sensitization and airway hyperresponsiveness / A. Haczku, K. Takeda, E. Hamelmann et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000.- Vol. 161, N 3, P. 952-960.
101. Hakonarson H. Autocrine interaction between IL-5 and IL-1 β mediates altered responsiveness of atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle / H. Hakonarson, N. Maskeri, C. Carter et al. // *J. Clin. Invest.* - 1999. – P. 657-667.
102. Hardman J.G. Cyclic nucleotides and smooth muscle contraction / J.G. Hardman // *Smooth muscle. An Assesment of current knowledge.* - Austin. Univ. Texas Press, 1981. - P. 249 - 252.
103. Helmerich E.J. Regulation of signal transduction by b-adrenergic hormone receptors / E.J. Helmerich, T. Pfeuffer // *Tip. Rev.* - 1985. - V. 4. - P. 439 - 443.
104. Hirota K. Effects of three different L-type Ca²⁺ entry blockers on airway constriction induced by muscarinic receptor stimulation / K. Hirota, E. Hashiba, H. Yoshioka et al. // *Br. J. Anaesth.* – 2003. – Vol. 90, N 5. – P. 671 – 675.
105. Hisada T. Properties of membrane currents in isolated smooth muscle cells from guinea pig trachea / T. Hisada, Y. Kurachi, T. Sigimoto // *Pflug. Arch* - 1990. - V. 416. - P. 151 – 161.
106. Hitoshi Y. In vivo administration of antibody to murine IL5 receptor inhibits eosinophilia of IL5 transgenic mice / Y. Hitoshi // *International Immunology.* - 1991. – N 3. – P. 135 – 139.
107. Huang C.Y. Mechanisms activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase / C.Y. Huang, V. Chan, P. B. Chock et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1981. - Vol. 78. - P. 871 – 874.

108. Huston D.P. Interleukin-5: a therapeutic target in asthma / D.P. Huston // *International Journal on Immunorehabilitation*. – 1997. - N 7. - P. 7-12.
109. Ichinose M. Histamine H₃-receptors inhibit cholinergic neurotransmission in guinea pig airways / M. Ichinose, C.D. Stretton, J.C. Schwartz et al. // *Br. J. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 97, N 1. - P. 13 - 15.
110. Imaizumi Y. The effect of tetraethylammonium chloride on potassium permeability in the smooth muscle cell membrane of canine trachea / Y. Imaizumi, M. Waanabe // *J. Physiol.* - 1981. - V. 316. - P. 33 – 46.
111. Ingvast-Zarsson G. Relaxant effect of theophylline and clenbuterol on tracheal smooth muscle from horse and rat in vitro / G. Ingvast-Zarsson // *J. Vet. J. Pharmacol. and Ther.* - 1991. - Vol. 14, N 3. - P. 310 - 316.
112. Ishikawa T. Inhibitory effects of interferon-gamma on the heterologous desensitization of beta-adrenoceptors by transforming growth factor-beta 1 in tracheal smooth muscle / T. Ishikawa, H. Kume, M. Kondo et al. // *Clin. Exp. Allergy*. – 2003. – Vol. 33, N 6. – P. 808-815.
113. Ito Y. The roles of stored calcium in contractions of cat tracheal smooth muscle produced by electrical stimulation, acetylcholine and high K⁺ / Y. Ito // *Br. J. Pharm.* - 1984. - Vol. 29. - P. 667 – 676.
114. Jacob C.O. Mapping of the interleukin 5 receptor gene to human chromosome 3 p25-p26 and to mouse chromosome 6 close to the raf-1 locus with polymorphic tandem repeat sequences / C.O. Jacob // *Mamm. Genome*. – 1993. – N 4. – P. 435-439.
115. Jeffrey R.C. Early phase bronchoconstriction in the mouse requires allergen-specific IgG / R.C. Jeffrey, G. Cieslewicz, M. Borchers et al. // *The Journal of Immunology*. – 2002. – Vol. 168, P. 4050-4054.
116. Jonson M. Mechanisms of action b₂-adrenoceptor agonists / M. Jonson, R. Coleman // *Asthma and Rhinitis*. – 1995. – P. 1278 – 1308.
117. Karaki H. Calcium release in smooth muscle / H. Karaki, G.B. Weiss // *Gastroenterology*. - 1984. - V. 87. - P. 960 – 970.

118. Katoh S. Maintenance of CD5+ B cells at an early developmental stage by interleukin-5: evidence from immunoglobulin gene usage in interleukin-5 transgenic mice / S. Katoh // *DNA and Cell Biology*. - 1993. – N 12. – P. 481-491.
119. Kohno S. Tonus of smooth muscles of isolated airway in situ / S. Kohno, K. Ohata // *Folia pharmacol. Japon.* - 1993. - Vol. 102, N 1. - P. 1 - 10.
120. Korosec L. The role of respiratory epithelium and mast cell histamine in the reactivity of the mouse isolated trachea / L. Korosec, F. Erjavec // *Acta physiol. Scand.* - 1992. – Vol. 146, N 608, Suppl. - P. 119.
121. Krishnakumar S. Non-adrenergic non-cholinergic excitatory innervation in the airways: role of neurokinin-2 receptors / S. Krishnakumar, E.P. Holmes, R.M. Moore et al. // *Auton. Autacoid. Pharmacol.* – 2002. – N 4. – P. 215 – 224.
122. Kume H. Regulation of Ca²⁺ dependent K⁺-channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation / H. Kume, A. Takai, H. Tomita // *Nature*. – 1989. – N 341. – P. 152 – 154.
123. Langer G.A. Calcium at the sarcolemma / G.A. Langer // *J. Mol. Cell. Cardiol.* - 1984. - V. 16. - P. 147 – 153.
124. Liedike C.M. α_1 -Adrenergic signaling in human airway epithelial cells involves inositol lipid and phosphate metabolism / C.M. Liedike // *Amer. J. Physiol.* - 1992 - 262, N 2, Pt 1. - P. 183 – 191.
125. Lin C.C. Bronchoconstriction and eosinophil recruitment in guinea pig lungs after platelet activating factor administration / C.C. Lin, C.Y. Lin // *J. Asthma*. – 1997. - N 2. – P. 153-160.
126. Maggi C.A. Potent contractile effect of endothelin in isolated guinea pig airways / C.A. Maggi, R. Patacchini, S. Giuliani et al. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1989. - Vol. 160. - P. 179 - 182.

127. McCaig D.J. Alteration of electrophysiological properties of airway smooth muscle from sensitized guinea pigs / D.J. McCaig, J.F. Souhrada // *Respir. Physiol.* – 1980. - P. 49-60.
128. McKenzie A.N. Structure-function analysis of interleukin-5 utilizing mouse/human chimerical molecules / A.N. McKenzie // *EMBO Journal* 10. – 1991. – P. 1191-1193.
129. Moffat J.D. The non-adrenergic, non-cholinergic innervation of guinea pig extrapulmonary airways / J.D. Moffat, J.R. VcLian, B. Dumsdey // *Proc. Austral. Physiol. and Pharmacol. Soc.* - 1995. – Vol. 26, N 1. - P. 90.
130. Moffatt J.D. Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea / J.D. Moffatt, T.M. Cocks, C.P. Page // *Br. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 141, N 7. –P. 1159-1166.
131. Morse B. Effects of IL-13 on airway responses in the guinea pig / B. Morse, J.P. Sypek, D.D. Donaldson et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2002. – Vol. 282, N 1. - P. 44-49.
132. Mrwa U. cAMP-dependent inhibition of smooth muscle actomyosyne / U. Mrwa, M. Troschka, J.C. Ruegg // *FEBS Lett.* - 1979. - Vol. 107. - P. 371 - 373.
133. Mu J.Y. The distribution of beta-adrenergic receptors in guinea pig lungs and their changes in experimental allergic asthma / J.Y. Mu, S. Bi // *Sci. China B.* – 1989. - N 10. – P. 1208-1214.
134. Nabe T. Leukocyte kinesis in blood, bronchoalveoli and nasal cavities during late asthmatic responses in guinea-pigs / T. Nabe, N. Shinoda, K. Yamashita et al. // *Eur. Respir. J.* – 1998. - N 3. - P. 636-642.
135. Ndukwu J.M. Immune sensitization augments epithelium dependent spontaneous tone in guinea pig trachealis / J.M. Ndukwu, J. Solway, K. Arbetter et al. // *Amer. J. Pfyiol.* - 1994. - № 5, Pt 1. - P. 2485 - 2492.

136. Nevala R. Comparison of the effects of nitric oxide donors and the β_2 -agonist salbutamol on the rat bronchial muscle in vitro / R. Nevala, K. Vaali, A. Peitola et al. // Hum. and Exp. Toxicol.-1995. – Vol. 14, № 10. – P. 832 - 840.
137. Nijkamp F.P. Nitric oxide and bronchial hyperresponsiveness / F.P. Nijkamp, G. Folkers // Arch. int. pharmacodyn. et ther. - 1995. - 329, N 1. - P. 81 - 96.
138. Nishinakamura R. Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions / R. Nishinakamura // Blood. – 1996. – Vol. 88, N 7. – P. 2458-2464.
139. Ohru T. Histamine N-methyltransferase controls the contractile response of guinea pig trachea of histamine / T. Ohru, K. Yamauchi, K. Sckizawa // J. Pharmacol. and Exp. Ther. - 1992. - Vol. 261, N 3.- P. 1268 - 1272.
140. Oosterhout A.J. Effect of anti-IL-5 and IL-5 on airway hyperreactivity and eosinophils in guinea-pig. / A.J. Oosterhout, A.R. Lodenius, H.F. Savelkoul et al. // Am. Rev. Respir. Dis.-1993.-Vol. 147.- P. 548-552.
141. Park S. Activation of tracheal smooth muscle contraction: synergism between Ca^{2+} and activators of protein kinase C / S. Park, H. Rasmussen // Physiol. Sci. - 1985. - Vol. 82. - P. 8835 - 8839.
142. Pauwels R.A. Cytokine manipulation in animal models of asthma / R.A. Pauwels, G.J. Brusselle, J.C. Kips // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1997. – Vol.156, N 4. – P. 78-81.
143. Pfueller T. Catalytic unit adenylatecyclase: purification and identification of affinity crosslinking / T. Pfueller, R.M. Dreher, H. Metzger // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1985. - Vol. 82. - P. 3086 - 3090.
144. Portanova J.P. Rapid and selective induction of blood eosinophilia in guinea pigs by recombinant human interleukin 5 / J.P.Portanova, L.J.Christine, S.H. Rangwala, R.P. Compton, J.L. Hirsch, W.G. Smith, J.B. Monahan // Cytokine. – 1995. – N 7. - P. 775-783.

145. Prie S. Synthesis of eicosanoids by isolated tracheocytes / S. Prie, M. Kaghni, J. Laporte et al. // *Amer. J. Physiol.* - 1991. - Vol. 260, N 1. - P. 349 - 355.
146. Qi H. The relationship between interleukin-8 and airway hyperresponsiveness in guinea pigs / H. Qi, K. Lu, W. Wang // *Chin. Med. J. (Engl.)*. - 1999. - N 11. - P. 985-987.
147. Ramos T. Interleukin 5 is a differentiation factor for cytotoxic T lymphocytes / T. Ramos // *Immunology Letters*. - 1989. - N 21. - 277-284.
148. Richard W.C. Antigen-induced hyperreactivity to histamine: role of the vagus nerves and eosinophils / W.C. Richard, M.E. Christopher, L.Y. Bethany et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* - 1999. - Vol. 276, N 5. - P. 709-714.
149. Robb L. Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5 / L. Robb // *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*. - 1995, - Vol.92, N 21. - P. 9565-9569.
150. Roux E. Role of sarcoplasmic reticulum and mitochondria in Ca(2+) removal in airway myocytes / E. Roux, M. Marhl // *Biophys. J.* - 2004. - Vol. 86, N 4. - P. 2583 - 2595
151. Sadeghi H. G. Guinea pig tracheal responsiveness in vitro role of nitric oxide/cyclic GMP pathway / H.G. Sadeghi, G. Folkerts, P. Henricks et al. // *Parm. World and Sci.* - 1993. - Vol. 15, N 6, Suppl. J. - P. 10.
152. Salvi S. Interleukin-5 production by human airway epithelial cells / S. Salvi, A. Semper, A. Blomberg et al.// *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 1999. - Vol. 20. - P. 984-991.
153. Sanderson C.J. Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (interleukin-5) and its effect on human and mouse B cells / C.J. Sanderson et al. // *Immunological Reviews*. - 1988. - N 102. P. 29-50.

154. Sato Y. Histopathological and immunohistochemical studies on experimental asthmatic model induced by aerosolized ovalbumin inhalation in guinea pigs / Y. Sato, T. Kishi, T. Umemura // *J. Toxicol. Sci.* – 1998. – N 1. - P. 69-75.
155. Scheid C.R. Mechanism of b-adrenergic relaxation of smooth muscle / C.R. Scheid, T.W. Honeyman, F.S. Fay // *Nature.* - 1979. - V. 277. - P. 32 - 36.
156. Schramm C.M. Mechanisms of protein kinase C regulation of airway contractility / C.M. Schramm, M.M. Grunstein // *J. Appl. Physiol.* - 1989. - Vol. 66, N 4. - P. 1935 - 1941.
157. Schuster M. Lymphocytes migrate from the blood into the bronchoalveolar lavage and lung parenchyma in the asthma model of the brown Norway rat / M. Schuster, T. Tschernig, N. Krug et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 161, N 2. - P. 558-566.
158. Shahid M. Cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme activities in human peripheral bronchi / M. Shahid, A.J. Pfilpott, J. Boer et al. // *Brit. J. Pharmacol.* - 1992. – N 105. - P. 1.
159. Shi H.-Z. Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics / H.-Z. Shi, Ch.-Q. Xiao, D. Zhong et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1998. - Vol. 157, N 1. – P. 204 – 209.
160. Springall D.R. Nitric oxide synthase in asthmatic human lung / D.R. Springall, Q.A. Hamid, L.K. Buttery et al. // *J. Pathol.* - 1993. - V. 169. - Suppl. - P. 153.
161. Sugimoto Y. Effects of apafant on PAF-induced downregulation of beta-adrenoceptors in guinea pigs / Y. Sugimoto, Y. Nakayama, H. Kishida et al. // *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 19, N 8. – P. 547-52.
162. Swain S.L. Evidence for two distinct classes of murine B-cell growth factors with activities in different functional assays / S.L. Swain, M. Howard, J. Kappler et al. // *J. Exp. Med.* – 1983. - P. 822-835.
163. Takaki S. Identification of the second subunit of the murine interleukin-5 receptor: interleukin-3 receptor-like protein AIC2B is a component

of the high affinity interleukin-5 receptor / S. Takaki et al. // EMBO Journal 10. - 1991. – P. 2833-2838.

164. Takaki S. Molecular cloning and expression of the murine interleukin-5 receptor / S. Takaki et al. // EMBO Journal. – 1999. – N 4. – P. 4367-4374.

165. Takata S. Tromboxane A₂ mimetic (U-46619) induces hyperresponsiveness of smooth muscle in the canine bronchiole, but not in the trachea / S. Takata, H. Aizawa, M. Shigyo et al. // Prostagland. Leucotrienes and Es-sent. Fatty Acids. - 1996. – Vol. 54, N 2. - P. 129 - 134.

166. Takatsu K. Interleukin-5 / K. Takatsu // Current Opinion in Immunology. - 1992. – N 4. – P. 299-306.

167. Takizawa T. Effects of a new antiallergic drug, VUF-K-8788, on infiltration of lung parenchyma by eosinophils in guinea pigs and eosinophil-adhesion to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) / T. Takizawa, C. Watanabe, I. Saiki et al. // Biol. Pharm. Bull. – 2001. - N 10. – P. 1127-1132.

168. Tavernier J. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF / J. Tavernier // Cell. – 1991. - N 66. - P. 1175-1184.

169. Tohda Y. Role of muscarinic acetylcholine receptors in a guinea pig model of asthma // Y. Tohda, R. Haraguchi, M. Itoh et al. // Int. Immunopharmacol. – 2002. – Vol. 2, N 11. – P. 1521-1527.

170. Tominaga A. Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor gene (IL-5) develop eosinophilia and autoantibody production / A. Tominaga, S. Takaki, N. Koyama, S. Katoh et al. // J. Exp. Med.- 1991.-Vol.173.- P. 429 – 437.

171. Torphy Th. Differential effects of methacholine and leukotriene D on cyclic nucleotide content and isoproterenol-induced relaxation in the opossum trachea / Th. Torphy // J. Pharmacol. exp. Ther. - 1986. - Vol. 237, N 1. - P. 332 - 340.

172. Tuypens T. Organization and chromosomal localization of the human interleukin 5 receptor alpha-chain gene / T. Tuypens // European Cytokine Network. - 1992. – N 3. – P. 451-459.

173. Underwood D.C. Food restriction-mediated adrenal influences on antigen-induced bronchoconstriction and airway eosinophil influx in the guinea pig / D.C. Underwood, J.K. Matthews, R.R. Osborn et al. // International Archives of Allergy and Immunology. – 1998. – P. 52-59.

174. Van Leeuwen B.H. Molecular organization of the cytokine gene cluster involving the human IL3, IL4, IL5, and GM-CSF genes on human chromosome 5 / B.H. Van Leeuwen // Blood. – 1989. - N 73. – P. 1142-1148.

175. Van Oosterhout A.J. Effect of anti-IL-5 and IL-5 on airway hyperreactivity and eosinophils in guinea pig / A.J. Van Oosterhout, A.R. Lodenius, H.F. Savelkoul et al // Am. Rev. Respir. Dis. - 1993. - Vol.147.- P. 548-552.

176. Walsh D.A. Regional substance P binding in guinea pig and human lungs / D.A. Walsh, M.Salmon, J. Wharton // Neuropeptides. - 1993. - Vol. 24, N 4. - P. 192.

177. Wang Y.X. FKBP12.6 and cADPR regulation of Ca^{2+} release in smooth muscle cells / Y.X. Wang, Y.M. Zheng, Q.B. Mei et al. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2004. – Vol. 286, N 3. – P. 538 - 546.

178. Wardlaw A.J. Eosinophils: biology and role in disease / A.J. Wardlaw, R. Moqbel, A. B. Kay // Adv. Immunol.-1995.- Vol.60.- P. 151-266.

179. Watanabe K. Calmodulin activated CN phosphodiesterase, microtubules and vinca alkaloids / K. Watanabe, W. West // Federat. Proc. 1982. - Vol. 41. - P. 2292 - 2299.

180. Wegner C.D. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma / C.D. Wegner, R.M. Gundel, P. Reilly et al. // Science. – 1990. - P. 456-459.

181. Wiklund C.U. Interactions of volatile anesthetics with cholinergic, tachykinin, and leukotriene mechanisms in isolated guinea pig bronchial smooth

muscle / C.U. Wiklund, U. Lindsten, S. Lim // *Anesth. Analg.* – 2002. – N 6. – P. 1650-1655.

182. Wu S.-J. Randomization of the receptor α -chain recruitment epitope reveals a functional interleukin-5 with charge depletion in the CD loop / S.-J. Wu J. Li, P. Tsui // *J. Biol. Chem.* – 1999. - Vol. 274, N 16. – P. 20479-20488.

183. Xie Q.M. Effects of cyclosporine A by aerosol on airway hyperresponsiveness and inflammation in guinea pigs / Q.M. Xie, J.Q. Chen, W.H. Shen et al. // *Acta. Pharmacol. Sin.* – 2002. – Vol. 23, N 3. – P. 243-247.

184. Yamaguchi H. Isoproterenol increases peripheral $[Ca^{2+}]$ and decreases inner $[Ca^{2+}]$ in single airway smooth muscle cells / H. Yamaguchi, I. Kajita, J. M. Madison // *Amer. J. Physiol.* - 1995. - Vol. 268, N 3, Pt 1. - P. 771 - 779.

185. Yamaguchi S. Time course study for antigen-induced airway hyperreactivity and the effect of soluble IL-5 receptor / S. Yamaguchi, H. Nagai, H. Tanaka et al. // *Life Sci.* – 1994. - Vol.54. - P. 471-475.

186. Yang Z.W. Use of star volume to measure the size of the alveolar space in the asthmatic guinea-pig lung / Yang Z.W., Y.H. Qin, S.R. Su // *Respirology.* – 2002. - N 7. – P. 117-121.

187. Yau K.I. The nonadrenergic noncholinergic system can modulate the effect of prokinetic agents on contractile response of isolated guinea pig trachea segments to electrical field stimulation / K.I. Yau, T.L. Hwang // *J. Formos Med. Assoc.* – 2002. – N 10. – P. 695 - 699.

188. Yokota T. Isolation and characterization of lymphokine cDNA clones encoding mouse and human IgA-enhancing factor and eosinophil colony-stimulating factor activities: relationship to interleukin 5 / T. Yokota // *Proceedings of the National Academy of Science (USA).* – 1987. - N 84. – P. 7388-7392.

189. Zou J. Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma /J. Zou, S. Young, F. Zhu et al. // BioMed Central Ltd Genome Biol. – 2002. – N3. – P. 1-13.