

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФИБРОЗА ЛЁГКИХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У БЕСПОРОДНЫХ КРЫС И ЕГО ПРЕИМУЩЕСТВА**Э. М. Шарипова, Д. А. Хасанова**

Бухарский государственный медицинский институт, Бухара, Узбекистан

Ключевые слова: экспериментальная модель, фиброз лёгких, беспородные крысы, моделирование фиброза лёгких на крысах.

Key words: experimental model, pulmonary fibrosis, outbred rats, rat model of pulmonary fibrosis.

Tayanch soʻzlar: eksperimental model, oʻpka fibrozi, zotsiz kalamushlar, kalamushlarda oʻpka fibrozini model-lashtirish.

Повреждение лёгких, вызванное воздействием вируса COVID-19, является наиболее важным в посткоронавирусный период. Эффекты индуцированного экспериментального воспаления респираторного тракта тщательно не изучены. В патогенезе развития фиброза в лёгких лежит местная и системная продукция провоспалительных цитокинов, в последствие сужением респираторных путей. В постковидные годы очень много исследований, описывающих признаки фиброза лёгких, таких как усиленная пролиферация фибробластов и отложение внеклеточного матрикса на поздних стадиях острого воспаления лёгких. В данной статье раскрыта моделирование фиброза в эксперименте, индуцированного ежедневным воздействием диоксида азота в верхние респираторные пути подопытных животных. Таким образом, следует отметить, что выбранное нами моделирование представляется возможным и эффективным, что позволяет изучать механизмы развития фиброза лёгких и пути ранней диагностики, своевременного лечения и профилактики.

OQ ZOTSIZ KALAMUSHLARDA EKSPERIMENTDA OʻPKA FIBROZINI MODELLASHTIRISH VA UNING AFZALLIKLARI**E. M. Sharipova, D. A. Xasanova**

Buxoro davlat tibbiyot instituti, Buxoro, Oʻzbekiston

COVID-19 virusi taʼsiridan kelib chiqqan oʻpkaning zararlanishi koronavirusdan keyingi davrda eng muhim hisoblanadi. Nafas olish yoʻllarining eksperimental ravishda kelib chiqqan yalligʻlanishining taʼsiri toʻliq oʻrganilmagan. Oʻpkada fibroz rivojlanishining patogenezi - yalligʻlanishga qarshi sitokinlarning mahalliy va tizimli ishlab chiqarilishi, natijada nafas yoʻllarining torayishi yotadi. Postkoviddan keyingi davrda oʻpka fibrozining belgilari tavsiflovchi koʻplab tadqiqotlar mavjud, masalan, oʻtkir pnevmoniyaning kech bosqichlarida fibroblastlar koʻpayishi va hujayradan tashqari matritsaning choʻkishi. Ushbu maqola eksperimental hayvonlarning yuqori nafas yoʻllarida azot dioksidining kundalik taʼsiridan kelib chiqqan tajribada fibrozni modellashtirishni tasvirlaydi. Shunday qilib, shuni taʼkidlash kerakki, biz tanlagan modellashtirish mumkin va samarali koʻrinadi, bu bizga oʻpka fibrozning rivojlanish mexanizmlarini va erta tashxis qoʻyish, oʻz vaqtida davolash va oldini olish usullarini oʻrganish imkonini beradi.

EXPERIMENTAL OUTBRED RATS MODELING OF PULMONARY FIBROSIS AND ITS ADVANTAGES**E. M. Sharipova, D. A. Khasanova**

Bukhara state medical institute, Bukhara, Uzbekistan

The impact of COVID-19 on lung function is the most important in the post-coronavirus period. The effects of induced experimental inflammation of the respiratory tract have not been thoroughly studied. The pathogenesis of the development of fibrosis in the lungs is local and systemic production of proinflammatory cytokines, followed by narrowing of the respiratory tract. In the post-COVID years, there are many studies describing the signs of pulmonary fibrosis, such as increased fibroblast proliferation and deposition of extracellular matrix in the late stages of acute lung inflammation. This article describes the modeling of fibrosis in an experiment induced by daily exposure to nitrogen dioxide in the upper respiratory tract of experimental animals. Thus, it should be noted that the modeling we have chosen seems feasible and effective, which allows us to study the mechanisms of pulmonary fibrosis development and ways of early diagnosis, timely treatment and prevention.

Введение. Заболеваемость идиопатическим легочным фиброзом (ИЛФ) была зарегистрирована в нескольких исследованиях по всему миру и, по-видимому, растет, но различные методологии установления случаев и системы классификации не позволили провести достоверное сравнение между исследованиями. Были изучены некоторые обзорные статьи разных стран о заболеваемости и распространенности, однако сегодняшние данные говорят о том, что нет статистического анализа данных об общей заболеваемости и смертности в мире [Hutchinson J. (2015)].

Была проведена работа по изучению медиастинальных лимфатических узлов пациентов с ИЛФ с обнаружением дифференциальных профилей экспрессии, чем у пациентов с раком легких, что указывало на различные иммуно-опосредованные пути, регулирующие фиброгенез и канцерогенез. Экспрессия PD-1 в медиастинальных лимфатических узлах со-

ответствует экспрессии в легочной ткани. Применение низких доз пембролизумаба могут оказывать антифибротическое действие. Клинические испытания, направленные на эндотипирование пациентов на основе профилирования медиастинальных лимфатических узлов и, соответственно, на внедрение таргетной терапии, такой как ингибиторы PD-1, весьма ожидаемы. С постепенным изучением патогенеза ИЛФ был достигнут новый прогресс в лечении ИЛФ [Karampitsakos T. (2023)].

Тем не менее, есть место для прогресса, прежде чем может быть достигнута удовлетворительная эффективность. Недавние эксперименты подтвердили, что путь PD-1/PD-L1 может взаимодействовать с различными типами клеток и путями и участвует в продвижении фиброза и иммунной регуляции при ИЛФ. Одновременно эксперименты на животных показали, что применение ингибиторов PD-1/PD-L1 уменьшает симптомы легочного фиброза. В этом кратком обзоре мы представляем эффекты PD-1/PD-L1 при ИЛФ; текущие исследования показывают, что это может предложить новое направление для будущей терапии ИЛФ [Tan J. (2024)].

Увеличение лимфатических узлов средостения (ЛУС) часто встречается при идиопатическом легочном фиброзе (ИЛФ) и, как известно, связано с тяжестью легочного фиброза. Однако не совсем ясна связь между ЛУС средостения и прогнозом ИЛФ на сегодняшний день [Sin S. (2017)].

Ещё одно исследование проводили по изучению популяции, которая состояла из 152 пациентов с ИЛФ, из которых 135 (89%) получали антифибротическое лечение ИЛФ во время последующего наблюдения за исследованием. Среди 62 пациентов с ЛНЭ, которые прошли последующее КТ грудной клетки и получили антифибротическое лечение, у 57 (92%) сохранялись признаки ЛНЭ средостения с течением времени [Sgalla G. (2020)]. По результатам установлено, что диффузное поражение лимфатических узлов средостения предсказывает клинически значимое функциональное ухудшение у пациентов с ИЛФ [De Souza Xavier Costa N, (2017)].

Существующие в настоящее время методы лечения ИЛФ имеют ограниченную эффективность и прогноз болезни остается неутешительным. Последним достижением в понимании нескольких взаимосвязанных патогенетических механизмов ИЛФ является выявление различных молекулярных фенотипов в результате сложных взаимодействий между генетическими, эпигенетическими, транскрипционными, пост транскрипционными, метаболическими и экологическими факторами. Для точной и ранней диагностики ИЛФ и улучшения прогноза течения болезни необходима разработка и валидация диагностических и прогностических биомаркеров [Намаканова О.А. (2024)]. Противофиброзная терапия потенциально новыми препаратами предполагает необходимость использования биомаркеров, благодаря которым возможны прогноз течения болезни и оценка эффективности лекарственной терапии, что в свою очередь способствует более широкому применению персонализированной терапии [Анаев Э.Х. (2017)].

Цель. В данной работе мы попытались создать моделирование фиброза лёгких на белых беспородных крысах, которое покажет, как в эксперименте формируется фиброзоподобное состояние в лёгких, что даёт возможность изучить взаимосвязь этой патологии с другими органами и системами, провоцированное введение в респираторные пути диоксида азота.

Материалы и методы. В моделировании фиброза лёгких в эксперименте были использованы половозрелые белые беспородные крысы, массой 180-220 г. Все требования по этике были соблюдены и утверждены протоколом Этического комитета Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан ((№ 6/16-1699 от 27.09.2022 г.) [Барноев А.И., 2023]).

Собственно фиброз лёгких провоцировали пассивным введением диоксида азота в респираторные пути подопытных животных. Для этого экспериментальных крыс помещали в специальный бокс и подвергали воздействию NO₂ 30-40 мг/м³ с помощью приспособленного вентилятора с выводной трубой, через которую выброс ядовитых веществ производится в открытый атмосферный воздух. С противоположной стороны имеется отдушина, плотно закрывающаяся во время отравления экспериментальных животных. Роль отравляющего вещества выполнило двуокись азота полученное путем химической реакции азотной кисло-

ты с металлом цинка. Для создания концентрации отравляющего вещества в пределах превышающую ПДК (разовая концентрация в воздухе 0,4 мг/м³), а именно 30-40 мг/м³ (модель предложена Л.Н. Даниловым с соавторами, 2009 год) использована реакция азотной кислоты с цинком внутри бокса.

В реакции использована концентрированная азотная кислота и Zn 0,08 мг соответственно. Концентрация в воздухе паров отравляющего вещества выведены путем химических и математических уравнений. В следствии реакции с металлом азотной кислоты выделяются пары ядовитого вещества двуокиси азота, которые при длительном отравлении в течении 90 дней ежедневно вызывают воспалительные соединительно тканые изменения в паренхиме легких. Внутри камеры был вмонтирован вентилятор для создания одинаковой концентрации NO₂ по всему объему бокса. Животные подвергались действию отравляющего ядовитого вещества ежедневно в течении 30 минут три раза в сутки с интервалом 15 минут между отравлениями. Интервалы проветривания камеры произведены для удаления накопившейся углекислого газа выделяющиеся при дыхании животных. Проветривание бокса производилось путем вытяжки по вытяжной трубе с открытой отдушиной камеры. После каждого проветривания камеры повторно нагнеталось отравляющее вещество

В результате было установлено, что спустя 60 суток в лёгких резко уменьшается поверхность висцеральной оболочки, дренирующая функция лимфатических узлов. В результате различная степень сужения лимфатических сосудов, достигших морфофункционального пассивного состояния, приводит к различной степени задержки тканевой жидкости в интерстициальной ткани легочной ткани, хроническим обструктивным и воспалительным заболеваниям легких. В более поздние сроки от 60 до 90 суток формировались значительные изменения в ткани лёгкого, такие как фиброз сосудов и периваскулярный фиброз, а также интерстициальный и межальвеолярный фиброз. При этих клинико-морфологических изменениях в бронхолегочных лимфатических узлах возникают функциональные изменения разной степени.

Экспериментальные животные были разделены на 2 группы по возрастам, 6- и 9-и месячные и соответственно им контрольные группы.

Изъятые образцы ткани лёгкого фиксировали в 10% формалине, заливали парафином, после затвердения готовили срезы стандартной толщины 6-7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и гистохимически краской альциановым синим. Готовые гистологические препараты изучались под бинокулярным микроскопом NLCD-307B (Novel, Китай). Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2010. Статистический анализ проводился с использованием программы IBM SPSS Statistics v.23 (разработчик - IBM Corporation).

Результаты и обсуждение. Предложенная нами модель использована для определения и изучения морфофункциональных и структурных изменений в ткани лёгкого и регионарных лимфатических узлов, в частности подмышечных и бронхопульмональных. В условиях эксперимента фиброз легких проявляется непрерывной сменой воспалительных процессов, патологических процессов и процессов репаративной регенерации. Значимая часть эксперимента смоделирована для изучения изменений в лимфатических узлах, тогда как долговременные изменения в ткани лёгких изучались поверхностно.

В нашем исследовании мы использовали модель фиброза лёгких, индуцированная пассивным введением отравляющего вещества в дыхательные пути крысы. Предлагаемая модель даёт оценивать поэтапно изменения в острый воспалительный период, хроническую обструктивную стадию и стадию хронического воспаления, а также более поздний период образования фиброза.

Моделирование длилось 90 дней, с промежуточным исследованием ткани легкого и регионарных лимфатических узлов на 30-й и 60-й день. Были изучены результаты, полученные от белых беспородных крыс в группе с моделированием фиброза лёгких, но не прошедшие коррекцию. Выявляются вторичные фолликулы, развивающиеся в зародышевом центре. В результате в лимфоидных фолликулах коры выявляют очаги диффузной гиперплазии. Во вторичных лимфоидных фолликулах светлоокрашенные клетки состоят из репро-

дуктивного центра (герминативного) и скопления лимфоцитов с темноокрашенной коронкой вокруг него. В зародышевом центре лимфоидных фолликулов обнаружены интенсивно растущие В-лимфоциты, лимфобласты, макрофаги, дендритные клетки и лимфоциты. Следующие результаты были получены при исследовании бронхопульмональных лимфатических узлов белых беспородных крыс с экспериментально вызванным пневмосклерозом легких.

Установлено, что в начальной стадии моделирования (30-й день) наблюдалось отложение небольшого количества коллагена, что говорит о только формирующемся фиброзе. Соответственно, для скопления большего количества коллагена в ткани лёгкого потребуется более длительный срок, учитывая данное заключение мы продолжили моделирование до 90 дней. Такое же заключение было принято в отношении изменений бронхолегочных лимфатических узлов.

Подводя итог, было установлено, что длительное воздействие диоксида азота на респираторные пути подопытных животных приводит к ожидаемым изменениям, а именно типичным признакам лёгочного фиброза с отложением коллагеновых волокон в ткани лёгкого, а также дало информативные результаты в исследовании регионарных лимфатических узлов. Всё вышеперечисленное подводит нас к чёткому пониманию проблемы легочного фиброза, что в свою очередь возможно поможет нам полностью избавить человечество от этого разрушительного заболевания в будущем.

Заключение. Представленное моделирование является неинвазивной, воспроизводимой и вполне осуществимой, которая проводилась введение диоксида азота в респираторные пути крыс. Более тщательное изучение патогенетических процессов легочного фиброза раскрывает понимание этой патологии в целом и возможных осложнений, а также дает возможность разыскивать новые пути в ранней диагностике, терапии и профилактики, в чём заключается главное преимущество нашего исследования.

Использованная литература:

1. Анаев Э.Х. Современные представления об идиопатическом легочном фиброзе: в фокусе – биомаркеры. Пульмонология. 2017; 27 (1): 56–64. DOI: 10.18093/0869-0189-2017-27-1-56-64
2. Барноев Ахтам Истамович, & Хасанова Дильноза Ахроровна. (2023). Создание экспериментальной модели легочного фиброза у крыс и его последствия. Conferencea , 43–46. Получено с <https://conferencea.org/index.php/conferences/article/view/2905>
3. <https://conferencea.org/index.php/conferences/article/view/2905>
4. Намаканова О.А. (2024). Экспериментальная модель легочного фиброза у мышей, индуцированная посредством аэрозольной доставки LPS // Российский иммунологический журнал. - 2024. - Т. 27. - №2. - С. 145-150. doi: 10.46235/1028-7221-16876-EMM
5. De Souza Xavier Costa N, (2017). Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. PLoS One. 2017 Sep 27;12(9):e0185474. doi: 10.1371/journal.pone.0185474. PMID: 28953963; PMCID: PMC5617199.
6. Hutchinson J. (2015) Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. Eur Respir J. 2015 Sep;46(3):795-806. doi: 10.1183/09031936.00185114. Epub 2015 May 14. PMID: 25976683.
7. Karampitsakos T. (2023) Expression of PD-1/PD-L1 axis in mediastinal lymph nodes and lung tissue of human and experimental lung fibrosis indicates a potential therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res. 2023 Nov 14;24(1):279. doi: 10.1186/s12931-023-02551-x. PMID: 37964265; PMCID: PMC10648728.
8. Sgalla G. (2020) Mediastinal lymph node enlargement in idiopathic pulmonary fibrosis: relationships with disease progression and pulmonary function trends. BMC Pulm Med. 2020 Sep 21;20(1):249. doi: 10.1186/s12890-020-01289-2. PMID: 32957969; PMCID: PMC7507660.
9. Sin S, Lee KH, Hur JH, Lee SH, Lee YJ, Cho YJ, Yoon HI, Lee JH, Lee CT, Park JS. Impact of mediastinal lymph node enlargement on the prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One. 2018 Jul 25;13(7):e0201154. doi: 10.1371/journal.pone.0201154. PMID: 30044866; PMCID: PMC6059471.
10. Tan J, Xue Q, Hu X, Yang J. Inhibitor of PD-1/PD-L1: a new approach may be beneficial for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. J Transl Med. 2024 Jan 23;22(1):95. doi: 10.1186/s12967-024-04884-7. PMID: 38263193; PMCID: PMC10804569.