

Экспериментальные исследования

САФЬЯНОВА Н. В.¹, ЧУХЛОВИН А.Б.¹,
ШАПОРОВА Н. Л.¹, ЗВАРТАУ Э. Э.¹,
ДРАВОЛИНА О. А.¹, КАШКИН В. А.¹,
КАМАЕВ А. В.¹, СИТНИКОВА М. Ю.²,
ФЕДОТОВ П. А.²

Возможности создания экспериментальной модели для изучения влияния табакокурения на β -адренорецепторы и М-холинорецепторы сосудов и бронхов

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

² Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. акад. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

e-mail: nsafyanova@yandex.ru

Реферат

Обзор посвящен проблемам выбора оптимальной экспериментальной модели хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) на животных для дальнейшего изучения влияния табакокурения и хронического воспаления на β_1 -, β_2 -адренорецепторы, М-холинорецепторы, экспрессию мРНК β_2 -адренорецепторов и оценке их чувствительности к лекарственному воздействию. Практическая значимость планируемой работы заключается в доклинической апробации альтернативных схем терапии, требующих длительного применения β_2 -агонистов и кардиоселективных β_1 -адреноблокаторов, в экспериментальной модели ХОБЛ на животных перед их клиническим внедрением в практику ведения пациентов с сочетанной кардиопульмональной патологией, которым показан прием как селективных β_2 -агонистов, так и кардиоселективных β_1 -адреноблокаторов.

Ключевые слова: экспериментальное моделирование, табакокурение, сердечно-сосудистые заболевания, хроническая обструктивная болезнь легких, β_1 -адренорецепторы, β_2 -адренорецепторы, М-холинорецепторы.

Safyanova N. V.¹, Chukhlovin A. B.¹, Shaporova N. L.¹,
Zvartau E. E.¹, Dravolina O. A.¹, Kashkin V. A.¹,
Kamaev A. B.¹, Sitnikova M. U.², Fedotov P. A.²

The possibility of creating an experimental model to study the effects of smoking on the β_1 -, β_2 -adrenergic receptors, M-cholinergic receptors of blood vessels and bronchi

¹ St-Petersburg State Medical University named after I. P. Pavlov

² V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg

e-mail: nsafyanova@yandex.ru

Abstract

The purpose of this review is to choose the best experimental animal model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in order to investigate the effects of smoking and chronic inflammation on the β -adrenergic receptors, M-cholinergic receptors, the mRNA expression of β_2 -adrenergic receptors and their sensitivity to the drug effects. The practical significance of the proposed work is in preclinical testing of alternative regimens, requiring prolonged use of β_2 -agonists and cardio selective β_1 -blockers, in an experimental animal model of COPD before clinical application of the management of patients with concomitant cardiopulmonary pathology, which is shown receiving a selective β_2 -agonists and cardioselective β_1 -blockers.

Keywords: experimental animal model, smoking, cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, β_1 -adrenergic receptors, β_2 -adrenergic receptors, M-cholinergic receptors.

Введение

Курение является общепризнанной причиной развития многих заболеваний и ежегодно убивает в России около 500 000 жителей [8]. Из всех смертей, обусловленных курением, 50 % приходится на сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), 25 % — на злокачественные новообразования, 14 % — на респираторные заболевания и 11 % — на другие причины смерти [66]. По оценке SCORE, 10-летний риск фатальных ССЗ у курильщиков удваивается [30, 59, 65]. Пассивное курение также увеличивает риск ССЗ приблизительно на 30 % [42, 48, 51, 82]. Механизмы развития ССЗ и серьезных клинических исходов у курящих во многом обусловлены дисфункцией эндотелия, которая способствует прогрессированию атеросклеротического поражения сосудов [10].

В развитых странах курение, как активное, так и пассивное, безусловно, является наиболее важным фактором риска развития хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). ХОБЛ занимает 4-е место в мире как причина смертности в возрастной группе старше 45 лет и является единственной болезнью, при которой смертность продолжает увеличиваться [39, 81]. В 80–90 % случаях ХОБЛ основным причинным фактором является сигаретный дым [68].

Глобальная инициатива по ХОБЛ (GOLD) в пересмотре рекомендаций от 2011 г. подчеркивает значимость коморбидности в оценке тяжести течения ХОБЛ у отдельных пациентов. Сердечно-сосудистая патология — главное сопутствующее заболевание при ХОБЛ, возможно, наиболее частое и наиболее значимое. У пациентов с ХОБЛ чаще встречается артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, имеется повышенный риск развития фибрилляции предсердий. Около 30 % пациентов со стабильным течением ХОБЛ имеют симптомы хронической сердечной недостаточности (ХСН). Доказано, что ОФВ1 является предиктором летальности при ХСН [44].

Патогенез ХОБЛ связан с хроническим воспалением, имеющим своим последствием ремоделирование бронхов с перестройкой архитектоники легкого, формирование эмфиземы и легочной гипертензии, как следствие, перестройки артерий легких с утолщением сосудистой стенки и уменьшением просвета сосудов [13, 91]. Хроническое воспаление, которое, с одной стороны, является универсальной реакцией на воздействие факторов риска развития болезни, а с другой — главной причиной всех функциональных и морфологических патологических изменений при ХОБЛ, лежит в основе возникновения и прогрессирования заболевания и затрагивает все отделы дыхательных путей, паренхиму и сосуды легких [5, 7].

Воздействие табачного дыма запускает процесс оксидативного стресса, повреждения тканей метаболитами реактивного кислорода — свободными радикалами, атомарным кислородом и перекисью водорода. Основными воспалительными агентами являются нейтрофилы и макрофаги. Нейтрофильная эластаза и матриксные металлопротеазы (например, ММР-1, ММР-9, ММР-12), выделяемые нейтрофилами и макрофагами, а также дисбаланс между ма-

триксными металлопротеиназами и их эндогенными ингибиторами, тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMPs) играют важную роль в деструкции альвеолярной стенки и формировании эмфиземы [18, 23, 31, 41, 43, 45, 53, 64, 76]. В ряде исследований показано, что сигаретный дым непосредственно индуцирует экспрессию ММР в резидентных клетках легких [60, 78, 86]. Цитокины, продуцируемые макрофагами запускают процесс образования CD8-T-лимфоцитов, которые тоже, в свою очередь, оказывают повреждающее действие на стенки альвеол [13]. Кроме того, окислители, присутствующие в сигаретном дыме, могут инактивировать защитный фермент, альфа1-антитрипсин, который препятствует разрушительному действию эластазы [40]. Доказана роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе воспаления при ХОБЛ. Курение инициирует повреждение эндотелия через непосредственное воздействие на эндотелиальные клетки и через высвобождение медиаторов воспаления, стимулируя экспрессию молекул адгезии и адгезию лейкоцитов на поверхности эндотелиальных клеток. [4]. Механизмы и причины формирования эндотелиальной дисфункции, ее роль в патогенезе как бронхолегочной, так и сосудистой патологии, активно изучались [9, 11].

Регуляция тонуса бронхиальной мускулатуры находится под контролем парасимпатической и симпатической нервной системы. Стимуляция парасимпатического отдела приводит к повышению тонуса бронхиальной мускулатуры, увеличивает секрецию слизистых желез дыхательных путей. Эти реакции обусловлены выделением ацетилхолина в окончаниях постганглионарных нервных волокон и влиянием на М-холинорецепторы. Определены 5 типов М-холинорецепторов. На гладкомышечных клетках дыхательных путей представлены в основном M_2 - и M_3 -холинорецепторы, в меньшем количестве M_1 -холинорецепторы. Холинергическая иннервация более выражена в проксимальных отделах бронхиального дерева. M_2 -холинорецепторы главным образом локализованы на постсинаптической мембране в синапсах парасимпатических волокон преимущественно в сердечной ткани: синоатриальном и атриовентрикулярном узлах, предсердиях. Помимо этого, M_2 -холинорецепторы расположены на пресинаптических мембранах в синапсах симпатических и парасимпатических волокон, на клеточных мембранах гладкомышечных клеток. M_2 -холинорецепторы являются ауторецепторами, и при их активации отмечается уменьшение количества выделяемого ацетилхолина в синапс [67]. M_3 -холинорецепторы характеризуются постсинаптической локализацией в синапсах постганглионарных парасимпатических волокон преимущественно на клеточных мембранах гладкой мускулатуры бронхов, сосудов, желудочно-кишечного тракта и желез внутренней секреции. На ранних стадиях ХОБЛ нарушается работа афферентного звена и постганглионарных пресинаптических M_2 -холинорецепторов, на поздних — снижается сократительная активность гладких мышц дыхательных путей [1].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

β_2 -адренорецепторы широко распространены в гладкой мускулатуре бронхов, на поверхности тучных клеток и эозинофилов, Т-лимфоцитов, в скелетной мускулатуре, матке, печени, на мембранах гладкомышечных клеток сосудов, в левом желудочке и в правом предсердии они составляют 26 % всех рецепторов. β_2 -адренорецепторы являются внесинаптическими, а также локализируются на пресинаптической мембране постганглионарных нейронов симпатического отдела нервной системы. Плотность β_2 -адренорецепторов на мембранах клеток гладкой мускулатуры бронхов увеличивается по мере уменьшения диаметра бронхов.

Существует перекрестная связь между холинорецепторами и адренорецепторами. Ацетилхолин стимулирует M_3 -холинорецепторы на гладкой мускулатуре бронхов, вызывая бронхоспазм, при этом он активирует ауторецепторы- M_2 -холинорецепторы, находящиеся на пресинаптической мембране, что предотвращает дальнейшее выделение ацетилхолина. Активация β_2 -адренорецепторов вызывает бронходилатацию, противостоя активации M_3 -холинорецепторов. При этом M_2 -холинорецепторы ингибируют активацию β_2 -адренорецепторов [6].

Регуляция тонуса гладкой мускулатуры дыхательных путей зависит от комплексного взаимодействия между воспалительным и нейрогенным процессами.

Очевидно, что при ХОБЛ перестройка бронхолегочной ткани затрагивает и нейрогенные структуры. В ответ на хроническое воспаление изменяется активность M -холинорецепторов. Наибольшую чувствительность к фармакологическим веществам проявляют M_2 - и M_3 -холинорецепторы. Стимуляция активного центра M_3 -холинорецепторов ацетилхолином влечет за собой активацию сигнального G-белка, который, в свою очередь, посредством активации фермента фосфолипазы C способствует повышению содержания в клетках вторичных мессенджеров диацилглицерола (ДАГ) и инозитола-

1,4,5-трифосфата (ИТФ), которые, в свою очередь, инициируют повышение концентрации ионов Ca^{2+} во внутриклеточной среде. В результате повышение содержания ионов Ca^{2+} в цитоплазме этих клеток происходит сокращение гладкомышечных клеток и/или усиление секреции желез [12]. Тактика, направленная на уменьшение воспаления, способствует увеличению числа тормозных пресинаптических M_2 -холинорецепторов, уменьшению постсинаптических M_3 -холинорецепторов на мембранах гладкомышечных клеток бронхов; увеличению активности ацетилхолинэстеразы в синапсе, как результат отмечается снижение бронхиальной гиперреактивности [20, 46].

Возможности фармакологической коррекции рецепторных нарушений при ХОБЛ является предметом пристального изучения ученых различных стран мира. В настоящее время β_2 -агонисты занимают одно из самых центральных мест в терапии бронхообструктивных заболеваний легких. Основной их эффект связан с расслаблением гладкой мускулатуры, улучшением мукоцилиарного клиренса и уменьшением сосудистой проницаемости.

Однако при их длительном применении, а также при использовании высоких доз β_2 -агонистов отмечается уменьшение количества β_2 -адренорецепторов и снижение их чувствительности, вероятно, как адаптация к регулярному воздействию длительно действующих β_2 -агонистов. Этот процесс происходит в результате активации специфических протеинкиназ, которые фосфорилируют рецепторы.

Снижение экспрессии и чувствительности β_2 -адренорецепторов приводит к увеличению количества несвязанного адреномиметического препарата, снижению его эффективности и к активации β_1 -адренорецепторов, что клинически может проявляться в повышении ЧСС, снижении содержания калия в крови, увеличении риска аритмий [76].

Эффективность одновременного применения антихолинергических и β_2 -адреномиметических

Преимущества и недостатки модели ХОБЛ, индуцированной сигаретным дымом и ЛПС

Таблица 1

Преимущества	Недостатки
Модель ХОБЛ, индуцированная сигаретным дымом	
Сходный этиопатогенез	Не воспроизводится степень тяжести ХОБЛ, соответствующая ХОБЛ 3 и 4 степеням у людей [16, 91]
Воспроизведение эмфиземы, ремоделирования бронхов, сосудов (легочной гипертензии) [16]	Нет прогрессирования после прекращения воздействия дыма [91]
Физиологические изменения, подобные наблюдаемым изменениям у людей	Требуется несколько месяцев экспозиции табачного дыма [26]
ЛПС-индуцированная модель ХОБЛ	
Краткосрочные модели с ремоделированием дыхательных путей и паренхиматозными изменениями [22]	Воспалительный инфильтрат не аналогичен тем, которые имеются при окуривании сигаретным дымом
Воздействие ЛПС производит некоторые анатомические особенности «человеческого» ХОБЛ [88]	
Могут быть полезны в исследованиях обострения [36]	

препаратов показана на уровне рецепторного взаимодействия, на улучшении клинического состояния при терапии ХОБЛ, а также уменьшении побочных эффектов [6].

В экспериментальном исследовании Lipworth and Williamson были отмечены полезные эффекты применения как неселективных, так и кардиоселективных β -адреноблокаторов, влияние их на уменьшение воспаления в бронхах, метаплазии эпителия и повышение регуляции β_2 -адренорецепторов. Относительно малая степень блокады β_2 -адренорецепторов, вероятно, достаточна для того, чтобы принести пользу. На фоне одновременной блокады β_2 -адренорецепторов и M_3 -холинорецепторов регистрировалась активация M_2 -холинорецепторов и увеличение количества β_2 -адренорецепторов, что приводило к бронхолитическому эффекту [54].

В данном обзоре обсуждаются различные экспериментальные модели на животных, которые были использованы в попытке воссоздать ХОБЛ, с описанием преимуществ и недостатков каждого из них. Ни одна из моделей не воспроизводит полностью изменения, наблюдаемые у людей.

При экспериментальном моделировании ХОБЛ у животных, в том числе индуцированной сигаретным дымом, не достигается степень тяжести, соответствующая ХОБЛ III–IV стадиям у людей. В то время как в человеческой популяции заболевание диагностируется преимущественно на поздних стадиях развития. Также следует отметить, что у людей на момент развития клинических проявлений ХОБЛ морфологические изменения в большинстве случаев уже необратимы и отказ от курения лишь замедляет прогрессирование ХОБЛ. У экспериментальных животных с ХОБЛ после прекращения воздействия на них табачного дыма отсутствует прогрессирование заболевания, более того, отмечается регрессия метаплазии бокаловидных клеток [16, 91].

Тем не менее индуцированная сигаретным дымом модель более точно приближена к «человеческой» ХОБЛ. Она позволяет воспроизвести ремоделирование бронхов, легочных сосудов, эмфизему и имеет характерные для нее системные проявления. Одним из недостатков данной модели является продолжительность экспозиции табачного дыма, длительность которой достигает около 6 месяцев [26].

Для уменьшения срока ремоделирования бронхов при воспроизведении ХОБЛ нами планируется комбинация экспозиции табачного дыма (в камере

курительной машины с использованием сигарет, содержащих никотин 1,3 мг/сиг., смолы 24 мг/сиг., 6 часов/день, 5 дней в неделю в течение 1 месяца) и интратрахеального введения липополисахарида клеточной стенки грамотрицательных бактерий на 2-й и 4-й неделе воздействия табачным дымом.

На современном этапе экспериментальная модель ХОБЛ способна помочь в понимании молекулярных и клеточных механизмов патогенеза заболевания, что в дальнейшем позволит расширить возможности медикаментозного воздействия [17].

Индукцированная сигаретным дымом модель ХОБЛ

Основным преимуществом данной модели может быть то, что используется один из основных факторов риска развития хронической обструктивной болезни легких у человека. Экспозиция табачным дымом экспериментальных животных вызывает ряд патологических особенностей ХОБЛ (ремоделирование бронхов и сосудов, эмфизему), системные проявления.

Имеется множество коммерческих и самодельных курительных машин, которые используются для создания модели, некоторые системы оказывают воздействие табачного дыма через нос (nose-only), некоторые — «на все тело» (whole-body) в экспозиционных камерах [2, 27].

Попытки создания модели ХОБЛ, индуцированной табачным дымом, приходится на конец 60-х гг. Существует теоретический недостаток окуривания всего тела, так как животные могут проглотить никотин или смолистые вещества при чистке меха. Тем не менее Mauderly et al. показали, что хотя этот фактор имеет место, уровень карбоксигемоглобина в сыворотке крови был меньше у животных, получавших воздействие табачного дыма «на все тело» [58].

Было зарегистрировано, что животные после экспозиции в камере меньше теряют в весе, чем после воздействия через нос, предполагая, что этот метод может быть предпочтительнее все же для того, чтобы избежать нежелательных стрессовых воздействий на животных.

В камере животные имеют свободный доступ к пище и воде в течение всего срока экспозиции табачного дыма. Кроме того, эта методика позволяет одновременно подвергнуть воздействию дымом большее количество животных и, следовательно, сделать процесс менее трудоемким [34].

Преимущества и недостатки эластазной модели ХОБЛ

Таблица 2

Преимущества	Недостатки
Может быть быстро индуцирована с помощью недорогих реагентов	Преимущественно имитирует эмфизему, чаще используется в моделировании хирургических методов лечения, нет ремоделирования бронхов
Тяжесть заболевания определяется дозой ферментов	Результаты непостоянны и меняются при выборе типа и дозировки фермента, вида и возраста животных [36, 91]
Подходит для изучения регенерационных процессов в легких	Обратимость изменений, после прекращения введения эластазы наблюдается повышение синтеза эластина и, в меньшей степени, коллагена [55]

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Современные экспериментальные исследования моделирования ХОБЛ, вызванной сигаретным дымом, проводились на лабораторных животных, включая мышей, крыс, морских свинок, кроликов, ягнят, собак и приматов [24, 25, 28, 33, 35, 57, 61, 92, 93].

Сигаретный дым представляет собой сложную смесь из более чем 5300 определенных компонентов [19]. Основные компоненты табачного дыма включают сухой конденсат (никотин и смола), влажный конденсат (TPM-total particulate matter), угарный газ (CO), содержание которых определяет тип исследовательских сигарет. Так, исследовательские сигареты типа 2R1 (Tobacco Research Institute, University of Kentucky, Lexington, KY) содержат максимальное количество каждого компонента: 38,8 мг влажного конденсата, 36,8 мг смол и 2,45 мг никотина в каждой сигарете диаметром 30 мм.

В качестве метода подтверждения воздействия дыма при создании любой модели полезно измерение уровня котинина (метаболита никотина) или карбоксигемоглобина (COHb). Количество COHb в крови определяется концентрацией CO во вдыхаемом воздухе (ppm — parts per million, количество частиц на миллион) и длительностью экспозиции.

При вдыхании фиксированной концентрации CO уровень COHb повышается в течение первых двух часов, затем выходит на плато в течение 3-х часов, достигая равновесия к 4–6 часу экспозиции. Моноксид углерода обладает сродством к гемоглобину в 200–250 раз выше, чем у кислорода.

Это достаточно ярко иллюстрировано примером из монографии Lawrence [52]. При наличии в плазме крови CO, создающего парциальное давление в 0,43 мм рт. ст. и O₂ с pO₂=100 мм. рт. ст., в крови будет содержаться по 50 % O₂Hb и COHb. Помимо вытеснения O₂ из O₂Hb, моноксид углерода изменяет структуру гемоглобина, увеличивая аффинитет гемоглобина к кислороду, затрудняя отдачу кислорода в тканях.

В результате развивается прогрессирующая гипоксия, которой подвержены в большей степени органы с высоким уровнем метаболизма (мозг, сердце, печень, почки) [14]. CO повышает концентрацию некоторых белков в крови (фибриногена, альфа1-антитрипсина, гаптоглобина, церулоплазмينا), что способствует воспалительным реакциям [9].

Для подтверждения патоморфологических и патофизиологических изменения на фоне курения выполняется оценка функции внешнего дыхания

(ОФВ1/ЖЕЛ, ООЛ); морфологическая оценка ремоделирования бронхов (метаплазия слизистой оболочки дыхательных путей, увеличение количества бокаловидных клеток, утолщение стенок за счет коллагена, лимфоидные агрегаты вокруг бронхиол); цитологическое исследование жидкости бронхоальвеолярного лаважа.

Проблема создания модели ХОБЛ, индуцированной курением, заключается в отсутствии определенного протокола. Отчасти эта проблема вызвана отличием восприимчивости разных видов экспериментальных животных к табачному дыму, а также техническими возможностями морфометрической оценки, использованием различных методик для окуривания животных (только через нос или всего тела, определение концентрации дыма, времени и частоты экспозиции), а также выбором выкуриваемых сигарет.

ЛПС-индуцированная модель ХОБЛ

Идеально отражает клинические проявления и патогенез бактериальных обострений ХОБЛ у людей [36]. Липополисахарид (ЛПС) является гликолипидным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

У животных при однократном интратрахеальном воздействии ЛПС индуцирует воспаление, характеризующееся инфильтрацией нейтрофилов и макрофагов, активацией CD4 Т-лимфоцитов, отложением лимфоидных агрегатов вокруг дыхательных путей и крупных сосудов, а также гиперчувствительность дыхательных путей [62, 80, 85, 87, 89]. Кроме того, увеличение количества бокаловидных клеток наблюдается после однократного воздействия ЛПС [22].

У животных, которые были подвержены хроническому воздействию ЛПС, описаны структурные изменения в легких, которые характерны для ХОБЛ [88]. Интересно, что за 12 недель при введении ЛПС два раза в неделю привело к повышенной экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF-α, ИФН-γ и ИЛ-18 (табл. 1).

Модель ХОБЛ, индуцированная апоптозом

В основе данной модели лежит активация каскада каспаз, вызванная эндотрахеальным введением активированной каспазы-3 с последующей индукцией апоптоза путем вмешательства в сосудистой фактор роста эндотелия (VEGF) или его рецептор (VEGF-R) и VEGF-VEGFR комплекса и формированием эмфиземы [47, 56, 83].

Преимущества и недостатки голод-индуцированной модели ХОБЛ [69–75]

Таблица 3

Преимущества	Недостатки
Краткосрочное создание модели	Не воспроизводит патофизиологические изменения, характерные для человека
Развитие голод-индуцированной эмфиземы, увеличение воздушного пространства	Не влияет на ремоделирование бронхов и сосудов легких
	С возобновлением кормления происходят некоторые обратимые изменения, однако сохраняется низкий уровень эластина [29]

Эти модели характеризуются увеличением воздушного пространства за очень короткий период времени (в течение 15 дней) и развитием легочной гипертензии [15]. Недостатками данного моделирования ХОБЛ является отсутствие ремоделирования бронхов и неспособность воспроизведения системных эффектов ХОБЛ в силу местного воздействия патогена [23, 36, 46].

Эластазная модель ХОБЛ

В настоящее время общепринято, что в основе индуцированной сигаретным дымом эмфиземы лежит нарушение баланса протеазной и антипротеазной активности. В 1963 г. Laurell и Eriksson сообщили, что эмфизема развивается у пациентов с дефицитом α_1 -антитрипсина [50]. В 1965 г. Gross et al. описана индукция эмфиземы легких у крыс при закапывании протеазы, папаина [37]. Протеаза/антипротеазная гипотеза была в значительной мере подтверждена в экспериментах, в которых эмфизема была вызвана введением эластолитических ферментов путем интратрахеального, интраназального закапывания или ингаляцией аэрозолей; эти модели в настоящее время называют общим термином «эластазная эмфизема». Почти во всех недавних исследованиях использовались свиная панкреатическая эластаза или нейтрофильная эластаза человека [49] (табл. 2).

Модель ХОБЛ, индуцированная голодом

Первые описания голод-индуцированной эмфиземы относятся к 70-м гг. Было исследовано влияние голода на постнатальный рост легких у крыс. Пометы морили голодом дважды, каждый раз в течение 24 часов, на 1-й день и на 5-й день жизни. Одна группа из помета была скарифицирована на 7-й день, а другая группа — на 14-й день постнатальной жизни. Периодическое голодание замедлило рост легкого. Это сопровождалось снижением соматического роста. На 7-й день объем легких, общее количество альвеол были снижены у голодных крыс, но структурно их легкие были похожие на легкие контрольной группы. На 14-й день наблюдались выраженные морфологические различия между легкими контрольной группы и группы с голодными крысами. После голодания замедление роста легких проявляется во всех изучаемых параметрах, уменьшение образования эластина привело к снижению альвеоляризации легких на 14-й день. Одна неделя нормального непрерывного кормления не смогла преодолеть голод-индуцируемое воздействие на растущую ткань легких. Был сделан вывод, что голодание вскоре после рождения отрицательно сказывается на нормальном развитии легких [69–75]. Также было показано, что лизилоксидаза, фермент, участвующий в образовании коллагена и эластина, был резко снижен в результате острого голодания и после возобновления кормления в течение 3 часов вернулся к нормальному уровню у взрослых крыс [29]. Голодание и снижение массы тела на 45 % стимулирует экспрессию гена каспазы и депрессию клеточной репликации, в то время как при возобновлении кормления увеличивается репликация клеток, синтез ДНК.

Данные результаты позволяют предположить обратимость изменений легочной ткани, индуцированных голоданием (табл. 3).

Модель ХОБЛ, индуцированная ингаляцией диоксида серы

Известен способ моделирования ХОБЛ — подобного состояния у животных путем ингаляций диоксида серы (SO_2), подвергая их непрерывному воздействию диоксида серы в дозах от 5 до 80 ppm (от 14 до 229 мг/м³) в течение 20–25 дней. Только при дозе 20 ppm или 57 мг/м³ было выявлено сочетание признаков воспаления дыхательных путей и гиперсекреции, которое трактовалось как ХОБЛ [90]. При другом моделировании использовали ингаляции диоксида серы в концентрации 250 ppm или 715 мг/м³ в режиме 5 ч/дн., 5 дн./нед., 7 нед. Снижение пиковой величины выдыхаемого потока воздуха (<80 % нормы) в сочетании с гистологическими признаками воспаления и гиперсекреции оценивали как патогенетические черты ХОБЛ. Воспроизводимость получаемой модели составляет 64 % [94]. Недостатки указанных способов заключаются в необходимости проведения многочасовых или непрерывных ингаляций, противоречивости приводимых авторами результатов при использовании большого диапазона концентраций диоксида серы и низкой воспроизводимости. Также не проводились длительные наблюдения за животными в постэкспозиционном периоде. Недостатки диоксида серы как индуктора воспалительного процесса в бронхах обусловлены его токсикологическими характеристиками. Диоксид серы обладает сильным раздражающим действием. Хорошо растворяясь в воде, он фиксируется слизистой оболочкой верхних дыхательных путей и достигает респираторных отделов лишь при высоких концентрациях, вызывающих токсическое поражение легочной паренхимы. Вместе с тем он способен вызывать бронхоспазм в достаточно низких концентрациях, не вызывающих альтерацию легочной ткани.

Модель ХОБЛ, индуцированная ингаляцией диоксида азота

В 1985 г. в результате обследования младших школьников и их матерей в Гонконге было изучено влияние диоксида азота (NO_2), содержащегося в воздухе загрязненной окружающей среды, на развитие респираторных заболеваний [63]. Диоксид азота (NO_2) является окислителем свободных радикалов, который может инициировать ряд разрушительных процессов в организме [77]. Выбор диоксида азота для моделирования ХОБЛ обусловлен тем, что основными этиологическими факторами развития воспалительного процесса при ХОБЛ являются табачный дым и поллютанты промышленного происхождения. Среди аэрогенных поллютантов наиболее агрессивен диоксид азота, концентрации которого в воздушной среде производственных и бытовых помещений в 10–100 раз превышают допустимые нормы. Диоксид азота — важный компонент табачного дыма, и значительная часть населения при курении (как активном, так и пассивном) подвергается воздействию диоксида

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

азота в сверхвысоких концентрациях, достигающих в табачном дыме 90–150 мг/м³. В отличие от диоксида серы оксиды азота, плохо растворяясь в воде, легко проникают до уровня терминальных бронхиол и альвеол. Обладая значительным окислительным потенциалом, диоксид азота взаимодействует с ненасыщенными липидами клеточных мембран, вызывая цепную реакцию выработки свободных радикалов и инициируя в легких окислительный стресс — важный механизм развития ХОБЛ, а также подавляет антиоксидантную защиту легких, окисляя низкомолекулярные восстанавливающие субстраты (глутатион, аскорбиновую кислоту, токоферол) и белки.

В СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова запатентована в 2008 г. модель ХОБЛ, индуцированная ингаляцией NO₂. Способ моделирования хронической обструктивной болезни легких включал ингаляционное введение лабораторным животным (взрослым крысам линии Wistar, самцам) диоксида азота в концентрации 30–40 мг/м³, ежедневно в течение 1,5–2 часов на протяжении 60 дней. Структурные изменения в крупных, средних, мелких бронхах и респираторной части легких, развивающиеся под воздействием ингаляции диоксида азота, были представлены признаками хронического воспалительного процесса с возможностью возникновения необратимой обструкции бронхов [3].

Генетические и генетически модифицированные модели ХОБЛ

Экспериментальные животные по-разному отвечают на воздействие табачного дыма. Отчасти это зависит от активности антиоксидантной защиты и уровня антипротеаз, а также от генетических факторов, которые контролируют врожденную и приобретенную воспалительную реакцию на табачный дым [21]. Генетически модифицированные животные позволяют исследовать влияние экспрессии специфического гена/белка, характеризующего все анатомические изменения, наблюдаемые при ХОБЛ, и являются полезными в дальнейшем проектировании новых терапевтических воздействий.

Заключение

Существует необходимость в доклинической апробации альтернативных схем терапии, включающей одновременное применение β_1 -адреноблокатора, β_2 -агониста и M₃-холинолитика, на экспериментальных животных моделях ХОБЛ. Нами планируется создание оригинальной модели ХОБЛ путем комбинации воздействия табачного дыма и интратрахеального введения ЛПС с дальнейшим изучением влияния табакокурения на β_1 -, β_2 -адренорецепторы, M-холинорецепторы сосудов и бронхов.

Выбор сочетания экспозиции табачного дыма (6 часов в день, 5 дней в неделю в течение 1 месяца) и интратрахеального введения ЛПС (дважды в течение месяца, на 2-й и 4-й неделе) обусловлен влиянием данных факторов, в первую очередь, на ремоделирование бронхов. К тому же дополнительное воздействие ЛПС позволит сократить сроки создания модели ХОБЛ. Целью нашей экспериментальной работы является количественная оценка экспрессии мРНК β_2 -адренорецепторов в гладкомышечных клетках бронхов методом ПЦР в реальном времени до воздействия табакокурения, на фоне хронического воспаления бронхов, а также определение чувствительности β_2 -адренорецепторов к лекарственному воздействию β_1 -адреноблокатора, β_2 -адреноагониста и M₃-холинолитика методом оценки морфологических изменений, характеризующих просвет бронхов, обратимость бронхообструкции в ответ на терапию. Для воспроизведения ХОБЛ нами выбрана мышьяная модель, поскольку мыши — наиболее широко используемый вид животных для исследования воздействия дыма, также в связи со сходством патогенетических врожденных и адаптивных иммунных механизмов ХОБЛ мыши и человека, достаточной изученностью анатомии, физиологии и геномного ряда мышей, а также коротким жизненным циклом и относительно низкой экономической стоимостью содержания этих животных [1, 16, 20, 46]. Из линейного ряда наш выбор остановлен на линии мышей C57BL, которые устойчивы к развитию опухоли легких и рекомендованы для моделирования эмфиземы [32, 38, 84, 95].

Литература

1. Бродская Т. А. и др. Экспериментальное моделирование хронической обструктивной болезни легких с табакокурением и проявления сосудистой дисфункции // Бюллетень с РАМН. 2009. № 1 (135). С. 60–65.
2. ГОСТ ИСО 3308-2003. Машина обычная лабораторная для прокуривания сигарет (курительная машина). Определения и стандартные условия. 01.01.2005.
3. Данилов Л. Н. и др. Способ моделирования ХОБЛ: патент от 25.03.08. Заяв. 2008111053/14МПК G09B23/28 (2006.01).
4. Жила О. В. и др. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе хронической обструктивной болезни легких на фоне курения и отказа от него // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2012. № 1 (41). С. 15–20.
5. Золотницкая В. П. и др. Определение нарушений кровообращения в легких у крыс при моделировании хронической обструктивной болезни // Росс. физиолог. журн. им. И. М. Сеченова. 2012. Т. 98. № 2. С. 242–249.
6. Зыков К. А., Агапова О. Ю. Ингаляционные бета-агонисты и М-холинолитики при бронхиальной астме с позиций рецепторных взаимодействий // Трудный пациент. 2011. № 11. С. 16–20.
7. Кузубова Н. А. Патологические механизмы формирования ХОБЛ: клинко-эксперимент. исслед.: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. 2009.
8. Масленникова Г. Я., Оганов Р. Г. Влияние курения на здоровье населения: место России в Европе // Профилактика заболеваний и укрепление здоровья. 2002. № 6. С. 17–20.
9. Монгирдиене А., Виежселиене Д., Куршветене Л. Воздействие никотина и смол, находящихся в табачном дыме, на процесс атерогенеза // Кардиология. 2012. № 9. С. 87–93.
10. Морозова Т. Е., Вартанова О. А., Михайлова Н. В. Дисфункция эндотелия при ишемической болезни сердца и возможности ее фармакологической коррекции // Клин. фармакол. и терапия. 2009. Т. 18. № 3. С. 45–49.
11. Петрищев Н. Н. Типовые формы дисфункции эндотелия // Клинико-лаборатор. консилуим. 2007. № 18. С. 31–36.
12. Петров В. И., Гаевый М. Д., Гаевая Л. М. Фармакология: учеб. для вузов. 2008.
13. Татарский А. Р. И др. Хроническая обструктивная болезнь легких // Consilium Medicum. 2004. Т. 6. № 4.
14. Торишин В. А. Клинически значимые дисгемоглобины. Карбоксигемоглобин // Лаборатория. 2007. № 1. С. 17–18.
15. Aoshiba K., Yokohori N., Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2003. № 28. P. 555–562.
16. Braber S. et al. Cigarette smoke-induced lung emphysema in mice is associated with prolyl endopeptidase, an enzyme involved in collagen breakdown // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2011. № 300. P. 255–265.
17. Bracke K. R. Role of proteases chemokine receptors in a murine model of chronic obstructive pulmonary disease // Thesis submitted to fulfil the requirements for the degree of « Doctor in Medical Sciences ». 2007.
18. Brusselle G. G. et al. Murine models of COPD // Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. 2006. № 19. P. 155–165.
19. Cahn Z., Siegel M. Electronic cigarettes as a harm reduction strategy for tobacco control: a step forward or a repeat of past mistakes? // J. Public Health Policy. 2011. № 32. P. 16–31.
20. Canning B. J. Modeling asthma and COPD in animals: a pointless exercise? // Curr. Opin. Pharmacol. 2003. № 3. P. 244–250.
21. Cavarra E. et al. Effects of cigarette smoke in mice with different levels of $\alpha 1$ -proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001. № 164. P. 886–890.
22. Chen L. et al. Toll-like receptor 4 relates to lipopolysaccharide-induced mucus hypersecretion in rat airway // Arch. Med. Res. 2009. № 40. P. 10–17.
23. Churg A. et al. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2002. № 27. P. 368–374.
24. Churg A. et al. Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs // Thorax. 2007. № 62. P. 706–713.
25. Churg A. et al. Cigarette smoke drives small airway remodeling by induction of growth factors in the airway wall // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006. № 174. P. 1327–1334.
26. Churg A., Cosio M., Wright J. L. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2008. № 294. P. 612–631.
27. Coggins C. R. A review of chronic inhalation studies with mainstream cigarette smoke in rats and mice // Toxicol. Pathol. 1998. № 26. P. 307–314.
28. D'Armiento J. et al. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema // Cell. 1992. № 71. P. 955–961.
29. Das R. M. The Effects of Intermittent Starvation on Lung Development in Suckling Rats // Am. J. Pathol. 1984. № 117 (2). P. 326–332.
30. Edwards R. The problem of tobacco smoking // BMJ. 2004. № 328. P. 217–219.
31. Finlay G. A. et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997. № 156. P. 240–247.
32. Foronjy R. F. et al. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006. № 173. P. 623–631.
33. Fukuda Y. et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in fetal rabbit lung // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2000. № 279. P. 555–561.
34. Goldklang M. P., Marks S. M., D'Armiento J. M. Second hand smoke and COPD: lessons from animal studies // Front. Physiol. 2013.
35. Golovatch P. et al. Role for cathepsin K in emphysema in smoke-exposed guinea pigs // Exp. Lung Res. 2009. № 35. P. 631–645.
36. Groneberg D. A., Chung K. F. Models of chronic obstructive pulmonary disease // Respir Res. 2004. № 5. P. 18.
37. Gross P. et al. Experimental emphysema: its production in normal and silicotic rats // Arch. Environ. Health. 1965. № 11. P. 50–58.
38. Guerassimov A. et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004. № 170. P. 974–980.
39. Halbert R. J. et al. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis // Eur. Respir. J. 2006. № 28. P. 523–532.
40. Harris J. E. Cigarette Smoke Components and

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Disease: Cigarette Smoke Is More Than a Triad of Tar, Nicotine, and Carbon Monoxide // *Smoking and Tobacco Control Monograph*. № 7. Chapter 5. 1996.

41. Hautamaki R. D. et al. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice // *Science*. 1997. № 277. P. 2002–2004.

42. He J. et al. Passive smoking and the risk of coronary heart disease — a meta-analysis of epidemiologic studies // *N. Engl. J. Med.* 1999. № 340. P. 920–926.

43. Houghton A. M. et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema // *J. Clin. Invest.* 2006. № 116. P. 753–759.

44. Hurd S. S. et al. Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD // *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)*. 2011.

45. Imai K. et al. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001. № 163. P. 786–791.

46. Joos G. F. Cigarette smoke in mice, rats and guinea-pigs: value to the study of pathogenic factors involved in COPD // *Experimental Models for COPD and Asthma*. 15 ERC. Copenhagen. 2005. P. 9–38.

47. Kasahara Y. et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema // *J. Clin. Invest.* 2000. № 106. P. 1311–1319.

48. Kenfield S. A. Smoking and smoking cessation in relation to mortality in women // *JAMA*. 2008. № 299. P. 2037–2047.

49. Khan M. A. et al. Kinetics of in vitro bronchoconstriction in an elastolytic mouse model of emphysema // *Eur. Respir. J.* 2007. № 30. P. 691–700.

50. Laurell C. B., Eriksson S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency // *Scand. J. Clin. Lab.* 1963. № 15. P. 132–140.

51. Law M. R. et al. Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence // *BMJ*. 1997. № 315. P. 973–980.

52. Lawrence M. All You Really Need to Know to Interpret Arterial Blood Gases. 2nd ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 1999. P. 91–92.

53. Lee E. J. et al. Proteomic analysis in lung tissue of smokers and COPD patients // *Chest*. 2009. № 135. P. 344–352.

54. Lipworth B. J., Williamson P. A. Think the impossible: β -blockers for treating asthma // *Clinical Science*. 2010. № 118. P. 115–120.

55. Lucey E. C. et al. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. Results of elastin and collagen mRNA in situ hybridization // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998. № 158. P. 555–564.

56. Marwick J. A. et al. Cigarette smoke disrupts the VEGF165-VEGFR2 receptor signaling complex in rat lungs and patients with COPD: morphological impact of VEGFR2 inhibition // *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2006. № 290. P. 897–908.

57. Massaro D., Massaro G. D. Developmental alveologenesis: longer, differential regulation and perhaps more danger // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2007. № 293. P. 568–569.

58. Mauderly J. L. et al. Comparison of 3 methods of exposing rats to cigarette smoke // *Exp. Pathol.* 1989. № 37. P. 194–197.

59. McNeill A. Tobacco use and effects on health. Ch. 1 // *Tobacco or health in the European Union*. 2004. P. 25–68.

60. Mercer B. A. et al. Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1

induction by cigarette smoke // *J. Biol. Chem.* 2004. № 279. P. 17690–17696.

61. Meshi B. et al. Emphysematous lung destruction by cigarette smoke: the effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002. № 26. P. 52–57.

62. Nagai H. et al. Participation of collagenase and elastase in LPS-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs // *Inflammation*. 1991. № 15. P. 317–330.

63. Neas L. M. et al. Association of indoor nitrogen dioxide with respiratory symptoms and pulmonary function in children // *Am. J. Epidemiol.* 1991. № 134. P. 204–219.

64. Ohnishi K. et al. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema // *Lab. Invest.* 1998. № 78. P. 1077–1087.

65. Perk-Chairperson J. et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012) // *Eur. Heart Journal*. 2012. № 33. P. 1635–1701.

66. Peto R. et al. Mortality from smoking in developed countries 1950–2000. URL: www.deathsfromsmoking.net. 2006.

67. Roffel A. F. et al. Muscarinic M2-receptors in bovine tracheal smooth muscle: discrepancies between binding and function // *Eur. J. Pharmacol.* 1988. № 153. P. 73–82.

68. Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999. № 160. P. 17–20.

69. Sahebji H., J. MacGee J. Changes in connective tissue composition of the lung in starvation and refeeding // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983. № 128. P. 644–647.

70. Sahebji H. Effects of postnatal starvation and refeeding on rat lungs during adulthood // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986. № 133. P. 769–772.

71. Sahebji H., Domino M. Effects of repeated cycles of starvation and refeeding on lungs of growing rats // *J. Appl. Physiol.* 1992. № 73. P. 2349–2354.

72. Sahebji H., MacGee J. Effects of starvation and refeeding on lung biochemistry in rats // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1982. № 126. P. 483–487.

73. Sahebji H., Vassallo C. L. Effects of starvation and refeeding on lung mechanics and morphometry // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1979. № 119. P. 443–451.

74. Sahebji H., Wirman J. A. Emphysema-like changes in the lungs of starved rats // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1981. № 124. P. 619–624.

75. Sahebji H., Vassallo C. L., Wirman J. A. Lung mechanics and ultrastructure in prolonged starvation // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1978. № 117. P. 77–83.

76. Salpeter S. R. Cardiovascular safety of β -adrenoreceptor agonist use in patients with obstructive airway disease: a systematic review // *Drugs Aging*. 2004. № 21 (6). P. 405–414.

77. Sauerbeck G. et al. Nitrogen dioxide and particle pollution near trunk roads and in towns of the south Midlands in England // *J. R. Soc. Health*. 2000. № 120. P. 183–187.

78. Seagrave J. et al. Effects of cigarette smoke exposure and cessation on inflammatory cells and matrix metalloproteinase activity in mice // *Exp. Lung Res.* 2004. № 30. P. 1–15.

79. Silverman E. K. Progress in chronic obstructive pulmonary disease genetics // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2006. № 3. P. 405–408.

80. Spond J. et al. Inhibition of experimental acute pulmonary inflammation by pirfenidone // *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2003. № 16. P. 207–214.

81. Stang P. et al. The prevalence of COPD: using smoking rates to estimate disease frequency in the general population // *Chest*. 2000. № 117. P. 354–359.

82. Steenland K. Risk assessment for heart disease and workplace ETS exposure among nonsmokers // *Environ Health Perspect.* 1999. № 107. Suppl. 6. P. 859–863.
83. Taraseviciene-Stewart L. et al. An animal model of autoimmune emphysema // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005. № 171. P. 734–742.
84. Thiesse J. et al. Lung structure phenotype variation in inbred mouse strains revealed through in vivo micro-CT imaging // *Journal of Applied Physiology.* 2010. Vol. 109. № 6. P. 1960–1968.
85. Toward T. J., Broadley K. J. Airway reactivity, inflammatory cell influx and nitric oxide in guinea-pig airways after lipopolysaccharide inhalation // *Br. J. Pharmacol.* 2000. № 131. P. 271–281.
86. Valenca S. S. et al. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke // *Toxicol. Pathol.* 2004. № 32. P. 351–356.
87. Vernooy J. H. et al. Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells. No role for tumor necrosis factor- α and infiltrating neutrophils // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2001. № 24. P. 569–576.
88. Vernooy J. H. et al. Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2002. № 26. P. 152–159.
89. Vincent D. et al. Intratracheal *E. coli* lipopolysaccharide induces platelet-dependent bronchial hyperreactivity // *J. Appl. Physiol.* 1993. № 74. P. 1027–1038.
90. Wagner U. et al. Analysis of airway secretions in a model of sulfur dioxide induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD) // *J. Occup. Med. Toxicol.* 2006. Vol. 1:12. doi :10.1186/1745-6673-1-12.
91. Wright J. L., Cosio M., Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2008. № 295. P. 1–15.
92. Wright J. L., Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990. № 142. P. 1422–1428.
93. Wright J. L., Tai H., Churg A. Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig // *J. Appl. Physiol.* 2006. № 100. P. 672–678.
94. Xu J., Zhao M., Liao S. Establishment and pathological study of models of chronic obstructive pulmonary disease by SO₂ inhalation method // *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2000. Vol. 113 (30). P. 213–216.
95. Yao H. et al. Cigarette smoke-mediated inflammatory and oxidative responses are strain-dependent in mice // *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2008. № 294. P. 1174–1186.