

Моделирование системной анафилаксии на мышах линии BALB/c

Н. В. Бельская, М. Г. Данилец, Ю. П. Бельский, Е. С. Трофимова,
Е. Г. Учасова, О. С. Борсук, В. И. Агафонов

*Научно-исследовательский институт фармакологии Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук, Томск*

Контактная информация: НИИ фармакологии СО РАМН, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

В данной работе поставлена цель обосновать возможность и показать преимущества моделирования системной анафилаксии на мышах линии BALB/c с использованием овальбумина. Эксперименты были проведены на мышах линии BALB/c в сравнении с мышами C57BL/6. Использованы различные режимы и схемы иммунизации овальбумином и проведена оценка степени тяжести анафилактического шока в зависимости от линии животных и схемы иммунизации. Оценена продукция Т-лимфоцитами селезенки цитокинов Th1 и Th2-профиля, а также определено содержание иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови в зависимости от числа иммунизаций. Показано, что результаты анафилактического шока в случае использования лошадиной сыворотки ниже, чем в случае применения овальбумина в качестве антигена. Авторы заключают, что индукция системной анафилаксии с использованием мышей линии BALB/c и овальбумина является добротной, адекватной и экономичной биологической моделью для исследования аллергических (иммуноглобулин-Е-зависимых) заболеваний.

Ключевые слова: анафилаксия; цитокины Th1 и Th2-профиля; иммуноглобулины класса Е.

Заболевания, связанные с патологией иммунной системы, являются важной медико-социальной проблемой современного общества. Наиболее интенсивный рост наблюдается в следующих группах иммунных болезней: аллергические и онкологические заболевания, а также синдром пониженной сопротивляемости организма инфекциям. Несмотря на успехи в области иммунофармакологии и разработки в последние годы рекомбинантных препаратов на основе человеческих цитокинов, индукторов интерферонов и др., проблема остается нерешенной, а указанные патологии, напротив, выходят на первое место в развитых странах и в мире.

Повышение распространенности инфекций, утяжеление протекания некоторых из них (например, туберкулеза),

возрастание лекарственно-устойчивых форм возбудителей, а также появление новых факторов, таких как глобализация, приводящих к усложнению эпидемиологической обстановки, – все это вынуждает мировое сообщество объединять усилия. Примером чего может служить проведение в Российской Федерации программ ВОЗ, три из пяти которых связаны с борьбой с инфекциями [10].

Частота встречаемости онкологических заболеваний неуклонно растет, при этом увеличивается и количество заболевших детей. Так, за последние 30 лет XX века ежегодный статистически значимый прирост данной патологии в странах Европы у детей в возрасте 1–14 лет составил 1%, у подростков 15–19 лет – 1,5% [29].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), частота встречаемости аллергических патологий за последние десятилетия возросла в 2–3 раза; аллергическими заболеваниями страдают около 1–3% взрослого и 10–20% детского населения планеты, а на протяжении жизни аллергические реакции проявляются почти у каждого третьего человека планеты [15].

Известно, что центральное место в регуляции иммунологической реакции принадлежит цитокинам, которые вырабатывают Т-хелперы (Th). Показано, что после дифференцировки и созревания в тимусе наивные Th-прекурсоры мигрируют в периферические органы иммунной системы, где под действием антигена необратимо дифференцируются в два разных типа Th1 или Th2 [27], которые различаются по набору секретируемых цитокинов [20]. Именно от качества поляризации зависят характер течения и итог иммунного ответа. Клинические проявления дисбаланса Th1/Th2 разнообразны и включают как инфекционные, так и неинфекционные патологии: хронические инфекции, аллергические, онкологические, аутоиммунные заболевания. Аллергии и аутоиммунные заболевания связаны с патологически избыточным Th2 либо Th1-типом иммунного ответа соответственно, хронические инфекции и онкологические заболевания сопровождаются недостаточным Th1-типом [12, 17, 21, 24, 25]. Характерными признаками Th1 являются повышенная секреция интерферона- γ , интерлейкина-2, фактора некроза опухоли β , индукция продукции В-клетками антител IgG2a, участие в реакции гиперчувствительности замедленного типа, защита от внутриклеточных паразитов, противоопухолевая активность. Th2-клетки выраба-

тывают интерлейкин-4, интерлейкин-5, интерлейкин-10, преобладают при гельминтозах и аллергиях, способствуют генерации иммуноглобулин-Е-синтезирующих В-клеток, играют важную роль в гуморальном иммунном ответе [13, 20, 28]. Основным фенотипическим признаком Th1 является высокая продукция интерферона- γ , а характерным признаком Th2 – повышенная продукция интерлейкина-4 [5, 22, 26]. Если 1 тип поляризации обеспечивает протективный клеточный иммунитет, то клинические проявления Th2-ответа более разнородны. Это либо реакции гиперчувствительности немедленного типа (анафилактические реакции, бронхиальная астма, гельминтозы), характерными признаками которых являются эозинофилия и повышенный синтез иммуноглобулинов класса Е (Ig E), либо состояния толерантности (оральная толерантность, беременность, опухольевый рост), для которых характерна гиперпродукция Т-лимфоцитами трансформирующего фактора роста α и интерлейкина-10 [11, 16].

Среди аллергических заболеваний наиболее распространенными являются иммуноглобулин-Е-зависимые болезни (такие, как бронхиальная астма, атопический бронхит, аллергический ринит, поллиноз, атопическая экзема, атопический конъюнктивит, крапивница). В основе иммунопатогенеза этих заболеваний лежит активация Th2, что приводит к повышенной продукции ряда цитокинов, основной из них – интерлейкин-4, который, в свою очередь, вызывает появление и поддержание на повышенном уровне синтеза иммуноглобулинов класса Е [6, 15]. Основными препаратами, используемыми в настоящее время для лечения иммуноглобулин-Е-

зависимых аллергических заболеваний, являются гистаминолитики, представленные блокаторами H_1 -рецепторов и стабилизаторами мембран тучных клеток, а в угрожающих жизни ситуациях (при бронхиальной астме) используются глюкокортикоидные средства [4]. Необходимость в лекарственных средствах, подавляющих эту избыточную активность Th2, для использования в терапии IgE-зависимых патологий достаточно очевидна и широко обсуждается в научной литературе (см., например, обзор [3]). Однако фармакологические средства, которые были бы направлены на основную причину иммуноглобулин-Е-зависимых патологий – на коррекцию баланса Th1/Th2, пока не созданы, хотя поиск таких средств является актуальным.

Совершенно очевидно, что поиск и создание такого типа противоаллергических препаратов нового класса невозможен без добротной, адекватной и экономичной биологической модели. С точки зрения целесообразности, наиболее подходящей моделью является системная анафилаксия, поскольку она позволяет дать интегральную оценку аллергенспецифическому Th2-типу иммунного ответа. Действительно, развитие и исход данной реакции охватывает все этапы и звенья патогенеза иммуноглобулин-Е-зависимых заболеваний от поляризации иммунного ответа в Th2-тип с последующей гиперпродукцией интерлейкина-4 и иммуноглобулинов класса Е, до этапа выброса медиаторов воспаления (таких, как гистамин, серотонин, брадикинин), повышения проницаемости кровеносных сосудов, развития отеков тканей, бронхоспазма, гиперсекреции мокроты в дыхательных путях и других гистохимических изменений, приводящих к угрозе

жизни организма. В методических рекомендациях по доклиническому изучению новых фармакологических веществ для моделирования системной анафилаксии предлагаются морские свинки, а в качестве сенсibilизирующего агента – лошадиная сыворотка [2]. Однако такой экспериментальный подход обладает рядом существенных недостатков. Морские свинки, во-первых, не экономичны как по стоимости, так и по содержанию. Кроме того, генетически контролируемые морские свинки (линейные) в нашей стране практически не доступны экспериментаторам, а проведение работ на беспородных животных приводит к низкой воспроизводимости результатов и широкому диапазону реакции внутри исследуемых групп. В-третьих, лошадиная сыворотка практически не стандартизуема, ее характеристики могут значительно отличаться партия от партии, что, соответственно, не может не влиять на воспроизводимость результатов анафилактического шока в разных сериях экспериментов.

Всех этих недостатков можно избежать в случае использования линейных мышей и коммерчески стандартизованного антигена. Целью данной работы было обосновать возможность и показать преимущества моделирования системной анафилаксии на мышах линии BALb/c с использованием овальбумина.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на конвенциональных линейных мышах линий C57BL/6Y (159 голов) и BALb/cY (210 голов). Использованы животные обоего пола в возрасте 8–9 недель, полученные из питомника НИИ фармакологии СО РАМН (1 категории согласно сертификату). Мыши содержались в неполной барьерной системе

(воздухообмен составлял 10–12 крат/ч, температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность $65 \pm 10\%$, световой режим 12:12 ч). Мыши размещались по 4–5 особей в клетках (VELAZ) со стерилизованной мелкой стружкой в качестве подстила, имели постоянный доступ к пище (стерилизованный гранулированный корм) и воде (кипяченая питьевая вода, подкисленная соляной кислотой до pH 4–4,5).

Сенсибилизацию мышей осуществляли подкожным (бедро) введением овальбумина (100 мкг/мышь, «Sigma») с гидроокисью алюминия (5 мг/мышь, «Sigma») в качестве адъюванта в объеме 0,1 мл 1, 2 или 3 раза с интервалом 1 или 2 недели между иммунизациями. Животным контрольной группы вводили по 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Сенсибилизацию мышей линии BALB/cY лошадиной сывороткой проводили, как описано ранее [1]. Разведенную изотоническим раствором хлорида натрия лошадиную сыворотку (1:10) вводили подкожно (в бедро) по 0,2 мл; контрольные животные получали только изотонический раствор хлорида натрия. Интервал между повторными инъекциями составлял 4 дня.

Для получения спленоцитов животных забивали дислокацией шейного отдела позвоночника под легким эфирным наркозом, выделяли селезенку, гомогенизировали ее. Полученную суспензию фильтровали через четырехслойный капрон, трижды промывали холодным изотоническим раствором хлорида натрия, ресуспендировали в культуральной среде (RPMI 1640 («Sigma») с добавлением 10% ЭТС («ICN», «Serva»), 20 мМ HEPES («Sigma»), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma»), 50 мкг/мл гентамицина («Sigma») и 2 мМ L-глутамина («Sigma»)). Жизнеспособность клеток суспензии оценивали в тесте с 0,1% трипановым

синим. В экспериментах использовали суспензии, содержащие не менее 95% жизнеспособных клеток. Клетки культивировали в атмосфере с 5% CO_2 и абсолютной влажности.

Получение супернатантов Т-лимфоцитов для определения продукции цитокинов получали, как описано ранее [30]. Для этого спленоциты культивировали 24 ч в концентрации 5×10^6 клеток/мл в присутствии Т-клеточного митогена (конканавалин А, «Sigma», 4 мкг/мл). Затем клетки удаляли центрифугированием, надосадок разливали на аликвоты и хранили при -20°C .

Определение продукции интерферона- γ Т-клетками в функциональном тесте осуществляли по способности их супернатанта индуцировать выработку оксида азота миелокариоцитами интактных сингенных животных [18]. Супернатант ($1/3$ и $1/6$ от общего объема) Т-лимфоцитов добавляли в 96-луночные круглодонные планшеты («Costar»), содержащие свежeweделенные клетки костного мозга (по $2\text{--}3 \times 10^5$ в лунке), культивировали 48 ч, собирали супернатант и измеряли в нем количество нитритов при помощи реактива Грейса [7]. Реактив (0,1 мл) смешивали с эквивалентным объемом супернатанта и измеряли абсорбцию при длине волны 550 нм. Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия.

Определение продукции интерлейкина-2 (ИЛ-2) Т-лимфоцитами осуществляли в функциональном тесте по способности их супернатанта стимулировать пролиферацию ИЛ-2-зависимых спленоцитов [18]. Для получения ИЛ-2-зависимых спленоцитов клетки селезенки культивировали в концентрации 4×10^6 /мл

с конканавалином А (4 мкг/мл) 36 ч, затем отмывали митоген центрифугированием и культивировали 48 ч в круглодонных 96-луночных планшетах (5×10^4 кл/лунку) с различными разведениями исследуемого супернатанта. Затем оценивали пролиферацию клеток радиоизотопным или колориметрическим методом и выражали соответственно в имп/мин или единицах оптической плотности. При использовании радиоизотопного метода за 16 ч до окончания культивирования клеток в лунки вносили по 0,5 мКю/лунку ^3H -тимидина. Затем содержимое лунок переносили на стекловолокнистые фильтры («Titertek»), промывали изотоническим раствором хлорида натрия, высушивали и переносили в сцинтилляционную жидкость, включение изотопа оценивали на β -счетчике. Оценку пролиферации колориметрическим методом осуществляли как описано ранее [19]. Клетки культивировали 4 суток в круглодонных 96-луночных планшетах ($2-5 \times 10^4$ кл/лунку) в указанных выше условиях. За 4 ч до окончания культивирования в лунки вносили 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, «Serva»), концентрация которого в лунках составляла 200 мкг/мл. Затем из лунок удаляли надосадок, а осадок растворяли диметилсульфоксидом (димексид, «Татхимфармпрепараты»). Абсорбцию полученных растворов измеряли при помощи многоканального спектрофотометра («Titertek») при длине волны 550 нм.

Определение количества интерлейкина-4 (ИЛ-4) в исследуемых супернатантах осуществляли твердофазным иммуноферментным методом при помощи тест-систем («Amersham Biosciences») согласно прилагаемым протоколам.

Содержание иммуноглобулинов Е в сыворотке крови определяли иммуно-

ферментным методом, для чего животных забивали через 7 дней после последней иммунизации, забирали кровь из сердца, получали сыворотку, разливали на аликвоты и хранили при -20°C . Содержание иммуноглобулинов в сыворотках измеряли с использованием соответствующих тест-систем («Immunology Consultants Lab.», США) согласно прилагаемому протоколу.

Общую анафилаксию моделировали, используя иммунизированных овалбумином или лошадиной сывороткой мышей. В ответ на внутривенное введение овалбумина (по 100 мкг в 0,1 мл физиологического раствора хлорида натрия в ретроорбитальный синус) или лошадиной сыворотки (по 0,2 мл неразведенной лошадиной сыворотки в ретроорбитальный синус) у них развивалась анафилактическая реакция. Выделяли следующие степени выраженности:

— 1 (слабая) степень – угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова,

— 2 (средняя) степень – угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова, цианоз конечностей, дыхание поверхностное и учащенное, клонические судороги, парезы, параличи,

— 3 (тяжелая) степень – гибель в течение 2–4 ч.

Полученные данные обрабатывали статистически с помощью программного обеспечения Statistica 6.0. Для каждой выборки вычисляли среднее значение величины признака X и ошибку средней величины m . Проверка гипотезы о равенстве средних проводилась с использованием t -критерия Стьюдента. Вычисленное значение t сравнивали с табличным при заданном уровне значимости $p < 0,05$. Если расчетная t была

больше табличной, то гипотеза о равенстве средних отвергалась.

Результаты

Введение разрешающей дозы антигена животным через 7 дней после однократной иммунизации (табл. 1) вызвало у всех мышей линии BALb/c слабую анафилактическую реакцию (1 степень), что проявлялось в изменении поведения животных (они выглядели угнетенными, вялыми, неподвижными). Указанные изменения появлялись через 5–10 минут после внутривенного введения антигена и наблюдались на протяжении 1–2 ч. Введение разрешающей дозы овальбумина мышам линии BALb/c через 7 дней после второй иммунизации, проведенной с интервалом 1 неделя, вызывало у большинства животных (у 26 из 27) анафилактическую реакцию 1 степени. Анафилактический шок, вызванный у мышей через 7 дней после второй иммунизации с интервалом 2 недели между инъекци-

ями, был более тяжелый. Все мыши выглядели угнетенными, вялыми, теряли подвижность, их шерстяной покров был взъерошен, конечности цианозны, дыхание поверхностное и учащенное, развивались параличи конечностей, животные принимали боковое положение через 30–40 минут после инъекции. У небольшого количества животных наблюдались клонические судороги, 57% (у 42 из 74) животных погибли в течение 2–4 ч. Еще более тяжелым был анафилактический шок у трехкратно иммунизированных мышей. В этом случае смертность составила 93% (54 из 58 животных).

У мышей линии C57BL/6 при тех же режимах иммунизации выраженность анафилактической реакции была слабее. Если у всех мышей линии BALb/c после однократной иммунизации реакция была 1 степени, то у 40% животных линии C57BL/6 ее вообще не было. Отсутствовала реакция и у 37,5% дважды им-

Таблица 1

Выраженность анафилактической реакции у мышей линий BALb/c и C57BL/6, сенсibilизированных одно-, двух- или трехкратным введением овальбумина (7 дней после последней иммунизации)

Линия мышей	Выраженность реакции	Однократная иммунизация		Двукратная иммунизация с интервалом 1 неделя		Двукратная иммунизация с интервалом 2 недели		Трехкратная иммунизация с интервалом 2 недели	
		абс. к-во	%	абс.к-во	%	абс. к-во	%	абс. к-во	%
BALb/c	Всего мышей	15	100,0	27	100,0	74	100,0	58	100,0
	нет реакции	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	1 степень	15	100,0	26	96,3	0	0,0	0	0,0
	2 степень	0	0,0	1	3,7	32	43,2	4	6,9
	3 степень	0	0,0	0	0,0	42	56,8	54	93,1
C57BL/6	Всего мышей	15	100,0	24	100,0	69	100,0	51	100,0
	нет реакции	6	40,0	9	37,5	0	0,0	0	0,0
	1 степень	9	60,0	15	62,5	10	14,5	0	0,0
	2 степень	0	0,0	0	0,0	53	76,8	30	58,8
	3 степень	0	0,0	0	0,0	6	8,7	21	41,2

Продукция ИФ-γ (концентрация нитритов, мкМ) и ИЛ-2 (включение ³H-тимидина, имп/мин или оптическая плотность) Т-лимфоцитами селезенки мышей линии BALb/c, сенсibilизированных одно-, двух- или трехкратным введением овальбумина с интервалом 2 недели между иммунизациями (X±m)

Копи- чество иммуни- заций	Сроки после послед- ней им- муниза- ции, дни	Разве- дение иссле- дуемого супер- натанта	ИФ-γ			ИЛ-2		
			контроль	опыт		контроль	опыт	
			концен- трация нитритов, мкМ	концен- трация нитритов, мкМ	% от кон- троля	включение ³ H-тимидина (имп/мин) ^а или оптиче- ская плот- ность ^б	включение ³ H-тимидина (имп/мин) ^а или оптиче- ская плотность ^б	% от кон- троля
1	7	1/6	6,1±0,8	5,8±0,7	95,3	*12600 ±1144	*14063 ±1210	108,4
		1/3	9,6±1,1	8,6±0,8	89,7	8532 ±1484	9246 ± 994	111,6
	14	1/6	10,1±1,9	9,5±1,6	94,4	*0,268 ±0,018	*0,236 ±0,015	88,2
		1/3	16,3±2,9	17,2±2,1	105,5	0,397 ± 0,018	0,377±0,017	94,9
2	7	1/6	15,1±0,9	10,5±1,3*	69,7	*0,347 ±0,014	*0,296 ±	85,3
		1/3	21,5±1,5	16,1±1,0*	74,9	0,439 ± 0,017	0,007* 0,348 ±0,022*	79,4
	14	1/6	12,2±1,2	7,6 ±1,1*	62,0	*0,379 ±0,017	*0,267 ±	70,5
		1/3	20,6±1,4	14,9 ±0,8*	72,4	0,525 ±0,038	0,035* 0,393 ±0,019*	74,8
3	7	1/6	8,0±0,6	<2	—	*16361 ±2915	*5334 ±	32,6
		1/3	12,7±0,4	3,0 ± 0,8*	24,0	23174 ± 2490	1251* 1270±1751*	54,8
	14	1/6	12,3±0,8	<2	—	*0,282 ±0,010	*0,171	60,6
		1/3	17,9±1,8	6,4±1,2*	35,7	0,396 ±0,033	±0,016* 0,243 ±0,005*	61,5

Примечание: * — различия с контролем достоверны (p<0,05), n=6

мунизированных мышей линии C57BL/6 (интервал между иммунизациями 1 неделя), в то время как у всех мышей линии BALb/c при аналогичной схеме иммунизации реакция была. У значительной части (76,8%) двукратно иммунизированных животных линии C57BL/6 (интервал между инъекциями овальбумина 2 недели) наблюдался анафилактический шок средней степени, и только 8,7% мышей погибли (среди мышей линии BALb/c смертность составила 56,8%). Среди трижды иммунизированных мышей ли-

нии C57BL/6 смертность от шока составила 41,2%, а у аналогично подготовленных мышей линии BALb/c — 93,1%.

Результаты исследования продукции основных цитокинов Th1-профиля представлены в табл. 2. После однократной иммунизации овальбумином с гидроокисью алюминия мышей линии BALb/c как через 7, так и через 14 дней после введения достоверных изменений в количестве продуцируемого интерферона-γ (ИФ-γ) и ИЛ-2 не наблюдалось. Двукратная иммунизация овальбумином приводила к сни-

Таблица 3

Продукция ИЛ-4 Т-лимфоцитами селезенки трижды иммунизированных овалбумином мышей линии BALb/c (7 дней после последней инъекции) ($X \pm m$)

Контроль (интактные животные)	Опыт (иммунизированные животные)	
концентрация ИЛ-4 (пг/мл)	концентрация ИЛ-4, пг/мл	% от контроля
163,1 $\pm$ 14,0	282,7 $\pm$ 18,6*	173,3

Примечание: * – различия с контролем достоверны ($p < 0,05$), $n=6$

Таблица 4

Содержание иммуноглобулинов класса E (IgE) в сыворотке крови иммунизированных овалбумином мышей линии BALb/c ($X \pm m$)

Количество иммунизаций	Содержание IgE, мкг/мл
– (контроль)	2,74 $\pm$ 0,46
1	4,90 $\pm$ 0,64*
2	7,36 $\pm$ 0,81*

Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$, $n=6$

жению выработки ИФ- γ : через 7 дней после второй иммунизации до 69,7% и 74,9% от контроля при разведениях исследуемого супернатанта $1/3$ и $1/6$ ($p < 0,05$) и через 14 дней после второго введения овалбумина – до 62,0% и 72,4% от контроля при разведениях исследуемого супернатанта $1/3$ и $1/6$ ($p < 0,05$). Так же достоверно ($p < 0,05$) снижалась продукция ИЛ-2: до 85,3% и 79,4% от контрольного уровня через 7 дней после последней инъекции; до 70,5% и 74,8% от контроля через 14 дней. Через 7 дней после третьей иммунизации при использовании супернатанта в разведении $1/6$ уровень нитритов был не детектабелен, что свидетельствовало о незначительном содержании в супернатанте ИФ- γ . При разведении $1/3$ некоторое количество данного цитокина определялось и составляло 24% от контроля ($p < 0,05$). В эти же сроки (7 дней после третьей иммунизации) наблюдалось падение выработки ИЛ-2: до 32,6% и 54,8% от контрольных значений (в разведениях супернатанта $1/6$ и $1/3$ соответственно; $p < 0,05$). Через 14 дней после третьей сенсibilизи-

Таблица 5

Продукция ИФ- γ (концентрация нитритов, мкМ) и ИЛ-2 (включение ^3H -тимидина, имп/мин) Т-лимфоцитами селезенки мышей линии BALb/c, сенсibilизированных лошадиной сывороткой ($X \pm m$)

Количество иммуни- заций	Сроки после последней иммуни- зации	ИФ- γ			ИЛ-2		
		контроль	опыт		контроль	опыт	
		концентрация нитритов, мкМ	концен- трация нитритов, мкМ	% от кон- троля	включение ^3H -тимидина, имп/мин	включение ^3H -тимидина, имп/мин	% от кон- троля
1	7	13,8 $\pm$ 1,0	15,1 $\pm$ 0,7	109,2	20956 $\pm$ 1194	20612 $\pm$ 1271	98,4
5	3	12,5 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 0,8*	41,8	16878 $\pm$ 1545	6710 $\pm$ 1069*	39,8
	7	15,8 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 0,7*	35,8	14649 $\pm$ 1779	7298 $\pm$ 402*	49,8

Примечание: * – различие с контролем достоверны ($p < 0,05$), $n=6$; разведение исследуемого супернатанта составляло $1/3$

Смертность мышей линии BALb/c, иммунизированных лошадиной сывороткой (пятикратное введение) или овальбумином (двукратное введение), в результате анафилактического шока, вызванного через 7 дней после последней иммунизации

Серия эксперимента	Количество животных		Доля погибших мышей, % от контроля
	всего	погибших	
Иммунизация лошадиной сывороткой			
1	12	2	17
2	12	5	42
3	10	5	50
4	11	10	91
5	12	12	100
Иммунизация овальбумином			
1	9	3	33
2	10	4	40
3	10	5	50
4	10	5	50
5	12	7	58

Примечание: все эксперименты были проведены в осенне-зимний период в разные годы

рующей инъекции супернатант в разведении $1/6$ не стимулировал продукцию оксида азота, что говорит о незначительном содержании в нем ИФ-γ. При разведении $1/3$ ИФ-γ определялся, его количество составляло 35,7% от контрольного уровня ($p < 0,05$). В эти же сроки содержание ИЛ-2 составляло около 60% от контрольных значений в обоих разведениях супернатанта ($p < 0,05$).

Определение содержания ИЛ-4 в супернатантах, полученных от трижды иммунизированных мышей линии BALb/c (7 дней после последнего введения овальбумина), показало (табл. 3) значительное увеличение содержания данного цитокина – 173% от контрольного уровня.

Содержание иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови мышей линии BALb/c, иммунизированных овальбумином, закономерно увеличивалось (табл. 4). Так, у однократно иммунизированных животных

его количество в 1,8 раза превышало контрольный уровень, у двукратно иммунизированных содержание иммуноглобулинов Е в 2,7 раза превосходило показатели интактных мышей.

Многократные сенсibilизирующие введения лошадиной сыворотки мышам линии BALb/c приводили к снижению продукции Т-лимфоцитами селезенки цитокинов Th1 профиля (табл. 5). При этом показатели, полученные через 3 и 7 дней после последней иммунизации, мало различались между собой: снижение вырабатываемого лимфоцитами ИФ-γ составляло 41,8% и 35,8% от контроля (3 и 7 сутки соответственно), а уровень ИЛ-2 достигал 39,8% и 49,8% от контроля (3 и 7 сутки соответственно). Однократная инъекция лошадиной сыворотки не вызывала какого-либо изменения в количестве вырабатываемых

Т-лимфоцитами исследуемых цитокинов.

Смертность мышей линии BALb/c от анафилактического шока при пятикратном введении лошадиной сыворотки составляла в разных сериях 17, 42, 50, 91, 100%, что сопоставимо с показателями в группах двукратно иммунизированных овалбумином мышей с интервалом между иммунизациями 2 недели – 33, 40, 50, 50, 58% (в таблице 6 приведены результаты 5 серий экспериментов для каждой из сенсibilизирующих схем). Доля животных, погибших после введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки, колебалась от 17% до 100% в зависимости от серии экспериментов, в то время как процент смертности среди мышей, получавших овалбумин, находился в диапазоне 33–58%.

Обсуждение результатов

Анафилаксия представляет собой одну из типичных иммунологических реакций, обусловленных поляризацией 2 типа. В качестве стандартного антигена, вызывающего данный вид поляризации, общепринятым является овалбумин, который используется чаще всего с гидроокисью алюминия в качестве адъюванта [23]. В своей работе мы сравнили тяжесть анафилактического шока, вызванного у мышей линии BALb/c, после одно-, двух- и трехкратной иммунизации (табл. 1). Кроме того, сравнили выраженность реакции при разных схемах в случае двукратной иммунизации: одна из них проводилась с интервалом 1 неделя между инъекциями, а другая – с двухнедельным интервалом. Оказалось, что анафилактический шок происходил даже после однократного введения овалбумина, однако при увеличении количества сенсibilизирующих инъ-

екций тяжесть шока нарастала, достигая максимальных значений у трехкратно иммунизированных животных – 93% погибших мышей. Интересно, что выраженность анафилактического шока у двукратно иммунизированных животных значительно зависела от интервала между сенсibilизирующими введениями овалбумина: практически все мыши (96%), иммунизированные с однонедельным интервалом, имели 1 степень тяжести шока, в то время как животные, иммунизированные с интервалом 2 недели, проявляли вторую (43%) и третью (57%) степень тяжести. Если при первой схеме гибели не наблюдалось, то при удлинненном интервале между инъекциями от шока погибали около половины мышей. Полученные результаты позволяют заключить, что оптимальной схемой подготовки животных к анафилактическому шоку является двух- или трехкратные иммунизации с интервалом 2 недели между инъекциями. Причем, двукратная схема пригодна для выявления веществ, способных как повышать, так и снижать выраженность Th2-зависимого иммунного ответа. Трехкратная схема, на наш взгляд, лучше соответствует цели выявить вещества с противоаллергическим действием.

Хорошо известно, что направление поляризации может зависеть не только от антигена, способа его попадания в организм, но и от генотипа. Показано, что линии мышей B10.D2, C57BL/6 и BALb/c в ответ на один и тот же стимул развивают разные типы иммунного ответа: B10.D2 и C57BL/6 склонны развивать Th1-зависимый клеточный ответ, связанный с высоким уровнем ИФ- γ , низким ИЛ-4, в то время как BALb/c – Th2-зависимый с высокой продукцией ИЛ-4 и низкой секрецией ИФ- γ [8, 9, 14]. Нам было интересно, возможно ли вызвать системную

анафилаксию у мышей линии C57BL/6, а также сравнить степень тяжести анафилактического шока у животных линий C57BL/6 и BALb/c (табл. 1). У почти половины (40%) однократно иммунизированных мышей линии C57BL/6, в отличие от BALb/c, анафилактическая реакция не выявлялась. У 63% двукратно сенсибилизированных мышей линии C57BL/6 реакция была 1 степени, в то время как почти у всех (96%) мышей линии BALb/c эта степень наблюдалась. Также значительно слабее реагировали мыши C57BL/6 на разрешающее введение антигена при двукратной схеме иммунизации с двухнедельным интервалом – только 8,7% из них погибли (по сравнению с 56,8% животных BALb/c). Также вдвое меньше погибли мышей линии C57BL/6, иммунизированных трижды – 41,2%, в то время как почти все мыши линии BALb/c при данной схеме иммунизации погибали. Таким образом, можно заключить, что системную анафилаксию можно вызывать у мышей линии C57BL/6, имеющих склонность развивать Th1-зависимый иммунный ответ, однако для достижения степени тяжести, аналогичной наблюдаемой у линии мышей BALb/c, требуется большее количество сенсибилизирующих инъекций овалбумина. Как и для мышей линии BALb/c, оптимальным режимом иммунизации для мышей линии C57BL/6 является двухнедельный интервал между повторными введениями антигена (овальбумина).

Как было сказано выше, развитие анафилаксии связано с Th2-типом поляризации иммунного ответа, для которого характерно снижение уровня цитокинов Th1-профиля (прежде всего, ИФ- γ) и увеличение выработки Т-лимфоцитами цитокинов Th2-типа (ИЛ-4), а также гиперпродукция иммуноглобулинов класса Е.

Однократная иммунизация мышей линии BALb/c вызывала значительное увеличение концентрации иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови (табл. 4), при этом продукция ИФ- γ и ИЛ-2 не изменялась (табл. 2). Двукратная иммунизация вызывала снижение выработки Т-лимфоцитами данных цитокинов, при этом концентрация иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови еще больше повышалась. При трехкратной иммунизации происходило значительное подавление продукции лимфоцитами цитокинов Th1-профиля (ИФ- γ и ИЛ-2) и повышение выработки основного Th2-цитокина – ИЛ-4 (табл. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что при введении мышам линии BALb/c овалбумина по выбранной нами схеме баланс Th1/Th2 сдвигается в сторону Th2 с развитием поляризации Th2-типа.

Известно, что парентеральное введение мышам лошадиной сыворотки приводит к анафилаксии [1]. Мы оценили признаки Th2-зависимого иммунного ответа (по продукции ИФ- γ и ИЛ-2) при иммунизации мышей линии BALb/c лошадиной сывороткой по схеме, рекомендованной вышеуказанными авторами. Как и в случае с овалбумином, однократное введение лошадиной сыворотки не вызывало изменений продукции цитокинов Th1-профиля (табл. 5). Пятикратная иммунизация с интервалом 4 дня приводила к значительному снижению уровня продукции данных цитокинов, по выраженности снижения сопоставимого с трехкратной иммунизацией овалбумином. Снижение продукции ИФ- γ и ИЛ-2 лимфоцитами селезенки при многократном введении лошадиной сыворотки следует рассматривать как свидетельство активации иммунной системы, происходящей по второму типу

поляризации (Th2), для которого характерно понижение продукции этих цитокинов [20].

Подтверждением того, что при многократных инъекциях лошадиной сыворотки развивается Th2-зависимый иммунный ответ, служат и данные анафилактического шока, наблюдавшегося после внутривенного введения лошадиной сыворотки иммунизированным животным (табл. 6). Количество погибших в результате анафилактического шока мышей колебалось от 17% до 100% в зависимости от серии эксперимента. Доля погибших животных при использовании для их иммунизации овальбумина также колебалась в разных сериях, но диапазон все же был гораздо уже, чем при иммунизации мышей лошадиной сывороткой. Поскольку все представленные серии проведены в аналогичное время года с использованием генетически контролируемых животных, то единственной причиной такого значительного разброса данных является качество самого антигена (лошадиной сыворотки), использованного для индукции системной анафилаксии. Экспериментаторы, имеющие дело с сывороткой, полученной из крови животных, и использующие ее для содержания клеточных культур, знают, что каждая партия сыворотки (причем любого производителя) может сильно отличаться от предыдущей. Поэтому каждую партию тестируют на клеточных культурах.

Следует заметить, что пятикратная иммунизация лошадиной сывороткой и двукратная овальбумином вызывают в среднем гибель половины животных от анафилактического шока. Хорошо известно, что стресс лабораторных животных, вызванный экспериментальными

манипуляциями, может в значительной мере влиять на результаты эксперимента. Поэтому задачей экспериментатора является снижение до минимума стрессорных влияний. С такой точки зрения двукратные инъекции предпочтительней пятикратных. Приведенные нами данные показывают, что иммунологические характеристики системной анафилаксии, вызванной лошадиной сывороткой или овальбумином, свидетельствуют об аналогичном типе поляризации. При этом воспроизводимость результатов в случае овальбумина несравнимо выше, чем при использовании лошадиной сыворотки.

Выводы

1. Двукратная и трехкратная иммунизация овальбумином мышей линии BALb/c с интервалом 2 недели между инъекциями позволяет получить модель системной анафилаксии с выраженным сдвигом баланса цитокинов Th1/Th2 в сторону Th2 и гиперпродукцией иммуноглобулинов класса E.

2. Использование лошадиной сыворотки для моделирования системной анафилаксии на мышах линии BALb/c вызывает развитие Th2-зависимого иммунного ответа, однако воспроизводимость результатов анафилактического шока значительно уступает модели, использующей овальбумин в качестве антигена.

3. Индукция системной анафилаксии с использованием мышей линии BALb/c и овальбумина является добротной, адекватной и экономичной биологической моделью для исследования аллергических (иммуноглобулин-Е-зависимых) заболеваний.

Список литературы

1. Емельяненко И. Н., Душкин В. А. Характеристика общей анафилаксии // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1971. №10. С. 69–71.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под ред. Р.У. Хабриева). М.:ОАО Изд-во Медицина, 2005. С. 494–495.
3. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Иммуно-модуляторы: механизм действия и клиническое применение // Иммунология. 2003. №4, С. 196–203.
4. Энциклопедия лекарств № 11. М.: Изд-во ООО РЛС-2004, 2004. С. 1086–1088.
5. Abbas A. K., Murphy K. M., Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes // Nature. 1996. Vol.383. P. 787–793.
6. Calder V. L. Cellular mechanisms of chronic cell-mediated allergic conjunctivitis // Clinical & Experimental Allergy. 2002. Vol.32, № 6. P. 814–817.
7. Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. 1982. Vol.126. P. 131–143.
8. Heinzel F. P., Sadick M. D., Holaday B. J. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets // J. Exp. Med. 1989. Vol.169. P. 59–72.
9. Hsieh C. S., Macatonia S. E., O'Garra A., Murphy K. M. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro // J. Exp. Med. 1995. Vol.181. P. 713–721.
10. <http://www.unrussia.ru/institutions/who.html>.
11. Khouiry S. J., Hancock W. W., Weiner H. L. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with down regulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain // J. Exp. Med. 1992. Vol.176, №5. P. 1355–1364.
12. Krug N., Frew A. J. The Th 2 cell in asthma: initial expectation yet to be realized // Clin. Exp. Allergy. 1997. Vol.27. P. 142–148.
13. Le Gros G., Ben Sasson S. Z., Seder R. et al. Generation of IL-4-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for the in vitro generation of IL-4 producing cells // J. Exp. Med. 1990. Vol.172. P. 921–924.
14. Locksley R. M., Heinzel F. P., Holaday B. J. et al. Induction of Th1 and Th2CD4+ subsets during murine Leishmania major infection // Res. Immunol. 1991. Vol.142. P. 28–32.
15. Mackay I. R., Rosen F. S. Allergy and allergic diseases // N. Engl. J. Med. 2001. Vol.344, №1. P. 30–37.
16. Maeda H., Shiraishi A. TGF-beta contributes to the shift toward Th 2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice // J. Immunology. 1996. Vol.156, №1. P. 73–78.
17. Mason D., Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells // Curr. Opin. Immunol. 1998. Vol.10. P. 649–655.
18. Moore S. C., Teus S. A., Barnett J. B., Soderberg L. S. F. Cytokine regulation of bone marrow natural suppressor cell activity in the suppression of lymphocyte function // Cell. Immunol. 1992. Vol.141. P. 398–408.
19. Mosmann T. R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. 1983. Vol.65. P. 55–63.
20. Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W. et al. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins // J. Immunol. 1986. Vol.136, №7. P. 2348–2357.
21. Nomura I., Goleva E., Howell M. D et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes // J. Immunol. 2003. Vol.171. P. 3262–3269.
22. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets // Immunity 1998. Vol.8. P. 275–283.
23. Oshiba A., Hamelmann E., Haczku A. et al. Modulation of antigen-induced B and T cell

responses by antigen-specific IgE antibodies // J. Immunol. 1997. Vol.159. P. 4056–4063.

24. **Pakala S. V., Kurrer M.O., Katz J. D.** T helper 2 (Th 2) cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice // J. Exp. Med. 1997. Vol.186. P. 299–306.

25. **Postlethwaite A. E., Holness M. A., Kattai H., Raghoebar R.** Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin-4 // J. Clin. Invest. 1992. Vol.90. P. 1479–1482.

26. **Romagnani S.** Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more // Immunol. Today. 1991. Vol.12. P. 256–260.

27. **Seder R. A., Gazzinelli R., Sher A., Paul W. E.** IL-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for IFN- γ production and

diminishes IL-4 inhibition of such priming // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1993. Vol.90. P. 10188–10192.

28. **Sornasse T., Larenas P. V., Davis K. A. et al.** Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level // J. Exp. Med. 1996. Vol.184. P. 473–478.

29. **Steliarova-Foucher E., Stiller C., Kaatsch P. et al.** Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCIS project): an epidemiological study // Lancet 2004. Vol.364. P. 2097–2105.

30. **Williamson E., Garside P., Bradley J. A.** IL-12 is a central mediator of acute graft-versus-host disease in mice // J. Immunol. 1996. Vol.157, № 2. P. 689–699.

Modelling of an anaphylaxis using BALb/c mice

N. V. Belska, M. G. Danilets, Y. P. Belsky, E. S. Trofimova, E. G. Utchasova, O. S. Borsuk, V. I. Agafonov

The aim of the research was to substantiate a possibility and to demonstrate an advantage of an anaphylaxis model using mice BALb/c and ovalbumin as antigen. Study had been carried out with mice BALb/c for comparison mice C57BL/6. Various procedures and plans of immunization by ovalbumin had been used; also, extent of anaphylactic shock weight had been evaluated in dependence of mice strains and immunization procedure. Th1/Th2 cytokine production by spleen-derived T cells and immunoglobulin E content in serum blood had been measured. It had been shown, that repeatability data of anaphylactic shock induced by a horse serum were lower than ones induced by ovalbumin. Authors concluded, that model of anaphylaxis in mice BALb/c induced by ovalbumin is a good, adequate and economical biological model for an investigation of allergic immunoglobulin E-dependent diseases.

Key words: anaphylaxis; Th1 and Th2 cytokines; immunoglobulin E.