

УДК: 57.084.1:615.35

**Дозозависимый эффект овальбумина и дексаметазона на степень
аллергического воспаления у морских свинок**
И.И.Самченко, В.В.Сирота, В.В.Кирошка, Т.П.Бондаренко

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)
ira_samchenko@ukr.net*

В работе изучали модель аллергического воспаления у морских свинок, вызванного чужеродным антигеном овальбумином при купировании клинических признаков различными дозами дексаметазона. Исследовали общую реакцию животного, а также уровень эффекторных клеток в бронхоальвеолярном лаваже в зависимости от используемой концентрации антигена и дозы дексаметазона. Показано, что выраженный синдром аллергического воспаления у морских свинок наблюдался при вторичной ингаляционной сенсибилизации 1% раствором овальбумина, что подтверждается высоким содержанием эффекторных клеток в бронхоальвеолярном лаваже. Максимальное купирование этого процесса происходит при 2-кратном введении дексаметазона (40 мкг/кг) за 1 и 24 часа до вторичной сенсибилизации.

Ключевые слова: модель аллергического воспаления, овальбумин, дексаметазон, эффекторные клетки, бронхоальвеолярный лаваж.

**Дозозалежний ефект овальбуміну і дексаметазону на ступінь алергічного
запалення у морських свинок**
I.I.Самченко, В.В.Сирота, В.В.Кирошка, Т.П.Бондаренко

У роботі вивчалася модель алергічного запалення у морських свинок, викликаного чужорідним антигеном овальбуміном при купіруванні клінічних ознак різними дозами дексаметазону. Досліджували загальну реакцію тварини, а також рівень ефекторних клітин у бронхоальвеолярному лаважі залежно від використуваної концентрації антигену і дози дексаметазону. Показано, що виражений синдром алергічного запалення у морських свинок спостерігався при вторинній інгаляційній сенсибілізації 1% розчином овальбуміну, що підтверджується високим вмістом ефекторних клітин у бронхоальвеолярному лаважі. Максимальне купірування цього процесу відбувається при 2-кратному введенні дексаметазону (40 мкг/кг) за 1 і 24 години до вторинної сенсибілізації.

Ключові слова: модель алергічного запалення, овальбумін, дексаметазон, ефекторні клітини, бронхоальвеолярний лаваж.

**Dose-dependent effect of ovalbumin and dexamethasone on the degree of
allergic inflammation in guinea-pigs**
I.I.Samchenko, V.V.Sirota, V.V.Kiroshka, T.P.Bondarenko

The model of allergic inflammation in guinea pigs caused by foreign antigen ovalbumin under arresting of clinical signs by various doses of dexamethasone has been studied. We investigated the overall reaction of the animal, as well as the level of effector cells in the bronchoalveolar lavage fluid depending on the concentration of antigen and dose of dexamethasone. It was shown that distinct syndrome of allergic inflammation in guinea pigs was observed at the secondary inhalation sensitization by 1% solution of ovalbumin, that was confirmed by a high content of effector cells in the bronchoalveolar lavage. Maximal arresting of this process occurs after double introduction of dexamethasone (40 mg/kg) for 1 and 24 hours prior to the secondary sensitization.

Key words: model of allergic inflammation, ovalbumin, dexamethasone, effector cells, bronchoalveolar lavage.

Введение

В отличие от многочисленных случаев болезни у человека, аллергическая астма не развивается в животном мире, поэтому возникает необходимость выявления нескольких характерных признаков астмы у животных. Существует несколько вариантов первичной сенсибилизации в зависимости от концентрации вводимого аллергена (Andersson, 1980). При этом еще одним из ограничивающих факторов является сложность получения исследуемого материала (бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), периферическая кровь) и его ограниченность по сравнению с человеческим. Об исследованиях подобного рода имеются лишь единичные сообщения (Чучалин,

1994; Andersson, 1980). Наиболее адекватная модель аллергического воспаления наблюдается у морских свинок, т.к. данный вид животных способен к внешним проявлениям признаков, характерных для развития аллергического воспаления.

Целью данной работы: на лабораторных животных получить модель аллергического воспаления, адекватную бронхиальной астме, путем подбора дозы овальбумина (ОВА) и терапевтической дозы дексаметазона.

Материалы и методы

В работе в качестве экспериментальных животных были использованы морские свинки весом 300–350 г, которые содержались в условиях вивария ИПКиК НАН Украины и получали стандартный пищевой рацион (нормативы ГОСТа «Утримання експериментальних тварин у розплідниках НДІ»). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с правилами «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1985) и под контролем Комитета по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

Исследование экспериментальной аллергической реакции замедленного типа проводили при сенсибилизации морских свинок ОВА по методу (Andersson, 1980) в модификации (Самченко и др., 2007). В работе проводили подбор дозы аллергена (ОВА), для чего животным дважды на 1 и 7 сутки внутрибрюшинно вводили раствор ОВА, по 100 мкг/100 г массы животного. На 21 сутки проводили вторичную ингаляционную сенсибилизацию 0,5% или 1% раствором ОВА. Ингаляцию проводили путем помещения животных в плексиглазовый бокс (30×15×20), соединенный с ультрасаническим небулайзером SPIRA, в течение 15 минут. Купирование признаков аллергического воспаления осуществляли путем 2-кратного внутримышечного введения дексаметазона в дозе 20 мкг/кг и 40 мкг/кг массы животного, соответственно за 24 часа и 1 час до начала вторичной сенсибилизации.

Общую реакцию животного на ингаляционное введение различных доз ОВА оценивали по индексу синдрома, который вычисляли по формуле Вейгла (Методические указания ..., 1998). За животными наблюдали в течение 30 минут. Оценку реакции производили по следующей четырехплюсовой системе:

А (+) – кратковременное почесывание носа, взъерошивание шерсти;

Б (++) – четко выраженные частые почесывания, единичные чихания;

В (+++) – спазматический кашель, боковое положение животного, отделение кала и мочи;

Г (++++) – спазм дыхательных путей, конвульсивное движение, судороги; гибель животных;

Д – реакция отсутствует.

Индекс синдрома аллергической реакции (И) вычисляли по формуле Вейгла:

$$И = [(А \cdot 1) + (Б \cdot 2) + (В \cdot 3) + (Г \cdot 4)] / (А + Б + В + Г + Д),$$

где А, Б, В, Г, Д – число животных с данной выраженностью синдрома.

Полученные результаты в контрольной группе сравнивали с результатами в опытной группе.

Животные были разделены на следующие группы (n=5):

1 – контрольная группа,

2 – ингаляционная сенсибилизация физиологическим раствором,

3 – ингаляционная сенсибилизация 0,5% раствором ОВА,

4 – ингаляционная сенсибилизация 1% раствором ОВА,

5 – ингаляционная сенсибилизация физиологическим раствором с в/м введением дексаметазона в концентрации 20 мкг/кг массы животного,

6 – ингаляционная сенсибилизация 0,5% раствором ОВА с в/м введением дексаметазона в концентрации 20 мкг/кг массы животного,

7 – ингаляционная сенсибилизация 1% раствором ОВА с в/м введением дексаметазона в концентрации 20 мкг/кг массы животного,

8 – ингаляционная сенсибилизация физиологическим раствором с в/м введением дексаметазона в концентрации 40 мкг/кг массы животного,

9 – ингаляционная сенсибилизация 0,5% раствором ОВА с в/м введением дексаметазона в концентрации 40 мкг/кг массы животного,

10 – ингаляционная сенсибилизация 1% раствором ОВА с в/м введением дексаметазона в концентрации 40 мкг/кг массы животного.

БАЛ получали по методу (Ковалева, 2000; Kasahara et al., 2005) у животных всех экспериментальных групп через 24 часа после вторичной сенсибилизации, для чего проводили трахеотомирование под эфирным наркозом. Для получения БАЛ в легкие через канюлю вводили охлажденный фосфатно-солевой буфер (PBS) три раза (по 5 мл) и выдерживали 3 мин, конечный объем собранной жидкости составлял 8 мл. Собранный БАЛ помещали на лед, а затем фильтровали.

Общую клеточность БАЛ определяли при помощи гемоцитометра (Меньшикова, 1987), используя стандартный морфологический критерий (Назаренко, 2000).

Оценку достоверности полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента в рамках пакета Excel.

Результаты и обсуждение

Как видно из представленных данных (рис. 1), наивысший индекс синдрома наблюдается у животных при проведении вторичной ингаляции 1% раствором ОВА (4-я группа).

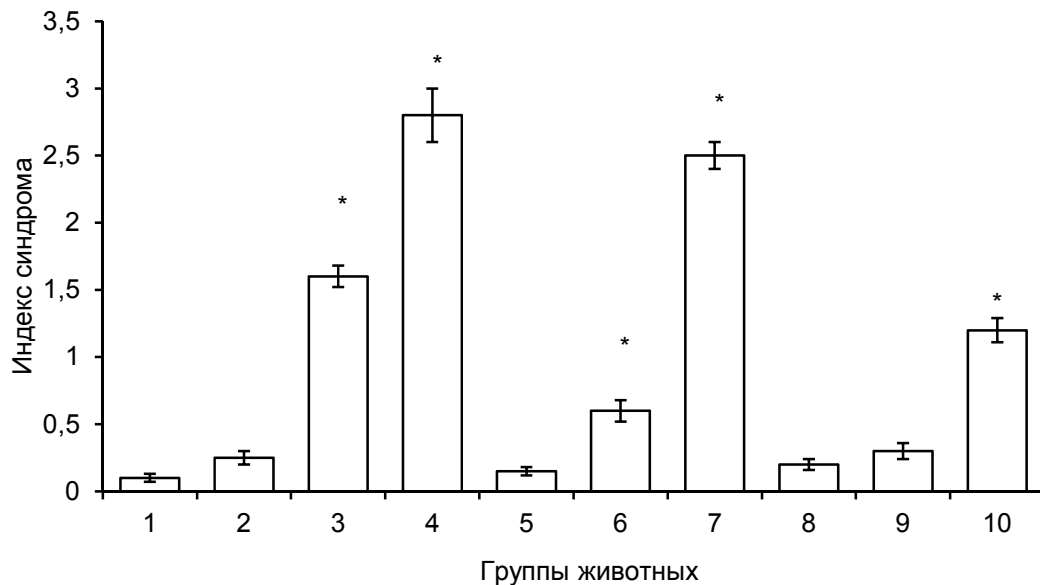


Рис. 1. Индекс синдрома, вычисленный по формуле Вейгла, в зависимости от дозы ОВА при вторичной ингаляции и дозы применяемого дексаметазона (n=5)

*Примечания: описание групп 1–10 в тексте, раздел «Материалы и методы»; * – $P < 0,05$ – различия достоверны относительно контрольной группы животных.*

В этом случае у всех животных отмечаются четко выраженные частые почесывания, чихания, у части морских свинок отмечался спазматический кашель, боковое положение, отделение кала и мочи. При вторичной ингаляции 0,5% раствором ОВА (3-я группа) у большинства экспериментальных животных отмечаются четко выраженные почесывания носа, взъерошивание шерсти, частые чихания. Однако спазматического кашля в этой группе животных не наблюдалось. Следовательно, можно сделать вывод, что наиболее выраженный синдром аллергического воспаления у морских свинок наблюдается при вторичной ингаляционной сенсибилизации 1% раствором ОВА.

Наиболее эффективными противовоспалительными препаратами для лечения аллергического состояния в настоящее время являются кортикостероиды (Gibson et al., 2000). Исследования продемонстрировали их эффективность, которая проявляется в улучшении функции легких, снижении гиперчувствительности бронхов, уменьшении симптомов болезни, уменьшении частоты и тяжести обострений и улучшении качества жизни. Учитывая вышесказанное, для купирования основных признаков аллергического состояния у экспериментальных животных в данной работе было проанализировано действие различных доз дексаметазона. Как показали экспериментальные данные (рис. 1), при введении дексаметазона в концентрации 20 мкг/кг массы животного при вторичной ингаляции 0,5% раствором ОВА (6-я группа) препарат оказывал противовоспалительное действие, т.е. у животных или отсутствовала реакция или же наблюдалось лишь взъерошивание шерсти. При вторичной сенсибилизации 1% раствором ОВА (7-я группа) данная доза гормона только снижала индекс синдрома. Использование дексаметазона в концентрации 40 мкг/кг массы животного привело к нивелированию признаков аллергического воспаления у экспериментальных животных, а именно при вторичной ингаляции 0,5% раствором ОВА (9-я группа) реакция сенсибилизированных животных не отличалась от контрольной группы (1-я и 8-я группы). В группе животных, вторично сенсибилизированных 1% раствором ОВА (10-я группа), отсутствовал спазматический кашель, а наблюдались только редкие чихания.

Таким образом, можно сказать, что введение дексаметазона в концентрации 40 мкг/кг массы животного за 24 часа и 1 час до вторичной ингаляции более полно снимает эффект аллергического воспаления у животных при вторичной сенсибилизации.

Известно, что основным признаком аллергического состояния является повышение гиперреактивности дыхательных путей, а данный показатель коррелирует с повышением количества эффекторных клеток в БАЛ. Причем считается, что эозинофильная инфильтрация дыхательных путей является характерной чертой астмы и позволяет дифференцировать это заболевание от других воспалительных процессов (Змушко и др., 2001; Йегера, 1990; Чернушенко, 2000; Barnes, 1996). В связи с этим мы считали целесообразным проанализировать, как изменяется количество эффекторных клеток в БАЛ через 24 часа после вторичной сенсибилизации в зависимости от используемой концентрации антигена и дозы дексаметазона.

Как видно из данных (табл. 1), самая высокая численность эффекторных клеток в БАЛ наблюдается у животных, которые были вторично сенсибилизированы 1% раствором ОВА (4-я группа). Видно, что у этой группы животных количество эозинофилов в БАЛ возрастает в 6 раз по сравнению с их уровнем у контрольной группы, лимфоцитов – в 5 раз, что подтверждает наличие у животных данной группы воспалительного аллергического процесса, характерного для такой патологии, как бронхиальная астма.

Таблица 1.

Клеточный состав БАЛ у морских свинок через 24 часа после вторичной ингаляционной сенсибилизации в зависимости от концентрации ОВА и дозы дексаметазона (n=5)

№	Группы животных	Клеточный состав БАЛ			Общее количество клеток ($\times 10^6$ в мл)
		Эозинофилы (%)	Лимфоциты (%)	Нейтрофилы (%)	
1	Контрольная	8,1 \pm 1,9	1,3 \pm 0,4	0,4 \pm 0,2	19,38 \pm 1,21
2	ОВА + физ. р-р	10,3 \pm 1,9	1,67 \pm 0,4	0,5 \pm 0,2	21,58 \pm 1,21
3	ОВА + 0,5% р-р ОВА	38,73 \pm 3,5*	7,8 \pm 1,5*	1,75 \pm 0,3*	48,98 \pm 1,91*
4	ОВА + 1% р-р ОВА	49,6 \pm 4,5*	10,6 \pm 1,7*	2,4 \pm 0,4*	57,36 \pm 2,26*
5	ОВА + физ. р-р + дексаметазон (20 мкг/кг)	7,28 \pm 1,9	1,43 \pm 0,4	0,44 \pm 0,2	20,58 \pm 1,21
6	ОВА + 0,5% р-р ОВА + дексаметазон (20 мкг/кг)	23,73 \pm 3,8*	4,68 \pm 1,5*	1,15 \pm 0,3*	34,98 \pm 1,91*
7	ОВА + 1% р-р ОВА + дексаметазон (20 мкг/кг)	31,73 \pm 3,7*	6,08 \pm 1,5*	1,35 \pm 0,3*	46,88 \pm 1,91*
8	ОВА + физ. р-р + дексаметазон (40 мкг/кг)	6,07 \pm 1,9	1,32 \pm 0,4	0,38 \pm 0,2	17,18 \pm 1,21
9	ОВА + 0,5% р-р ОВА + дексаметазон (40 мкг/кг)	14,3 \pm 2,5	1,85 \pm 1,3	0,45 \pm 0,3	24,75 \pm 1,85
10	ОВА + 1% р-р ОВА + дексаметазон (40 мкг/кг)	18,1 \pm 2,7	2,95 \pm 1,1	0,63 \pm 0,2	27,56 \pm 1,77

Примечание: * – $P < 0,05$, различия достоверны относительно контрольной группы животных.

При этом можно наблюдать достоверное повышение по сравнению с контролем всех указанных показателей у группы животных, вторично сенсибилизированных 0,5% раствором ОВА (3-я группа), в отличие от 2-ой группы, которой не вводилась разрешающая доза антигена. Целью введения животным дексаметазона на этапе вторичной сенсибилизации было купирование признаков аллергического воспаления, вызванного аллергеном. Исходя из данных табл. 1, можно наблюдать

эффективное действие дексаметазона в концентрации 40 мкг/кг. Так, количество эозинофилов было снижено как у животных, получивших 0,5% раствор ОВА, так и у животных, получивших 1% раствор ОВА, до значений, близких к контролю, а значения таких показателей, как лимфоциты и нейтрофилы, снижались до уровня контроля. Дексаметазон в концентрации 20 мкг/кг дает незначительное снижение количества эффекторных клеток, что не позволяет рекомендовать его использование как противовоспалительного препарата для лечения аллергического состояния.

Выводы

1. На основании анализа полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что для получения наиболее адекватной модели аллергического состояния у морских свинок необходимо проводить первичную сенсibilизацию аллергеном (ОВА) дважды на 1 и 7 сутки внутрибрюшинно по 100 мкг/кг массы тела, а вторичную сенсibilизацию – 1% раствором ОВА с помощью небулайзера в течение 15 минут.

2. Наиболее выраженный синдром аллергического воспаления у морских свинок наблюдается при вторичной ингаляционной сенсibilизации 1% раствором ОВА, что подтверждается высоким содержанием эффекторных клеток в бронхоальвеолярном лаваже.

3. Максимальное купирование этого процесса происходит при 2-кратном в/м введении дексаметазона (40 мкг/кг) за 1 и 24 часа до вторичной сенсibilизации.

Список литературы

Змушко Е.И., Белозеров Е.С., Митин Ю.А. Клиническая иммунология: руководство для врачей. – СПб: Питер, 2001. – 576с.

Йегера Л. Клиническая иммунология и аллергология: в 3 томах. – М.: Медицина, 1990. – Т.1.– 528с.

Ковалева В.Л. Методические указания по изучению фармакологических веществ, предназначенных для терапии бронхиальной астмы и других обструктивных заболеваний дыхательных путей // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Москва, 2000. – С. 242–249.

Меньшикова В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. – М.: Медицина, 1987. – 368с.

Методические указания. МУК 2.3.2.721-98. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище (Утв. главным государственным санитарным врачом РФ 15.10.1998).

Назаренко Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – М.: Медицина, 2000. – 544с.

Самченко И.И., Кирошка В.В., Грошевой М.И., Бондаренко Т.П. Состояние гиперактивности дыхательных путей морских свинок с моделью бронхиальной астмы при трансплантации органотипической культуры надпочечников // Биологический вестник. – 2007. – Т.11, №1. – С. 67–72.

Чернушенко Е.Ф. Иммунология бронхиальной астмы // Укр. пульмон. журн. – 2000. – №2, дополнение. – С. 19–21.

Чучалин А.Г. Бронхиальная астма: глобальная стратегия // Тер. архив. – 1994. – Т.3. – С. 3–8.

Andersson P. Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs // Allergy. – 1980. – Vol.35, №1. – P. 65–71.

Barnes P.J. Pathophysiology of asthma // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1996. – Vol.42. – P. 3–10.

Gibson P.G., Saltos N., Borgas T. Airway mast cells and eosinophils correlate with clinical severity and airway hyperresponsiveness in corticosteroid-treated asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 2000. – Vol.105. – P. 752–759.

Kasahara D.I., Perini A., Lopes F.D.T.Q.S. et al. Effect of salbutamol on pulmonary responsiveness in chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2005. – Vol.38. – P. 723–730.

Представлено: В.В.Єфімовим / Presented by: V.V.Yefimov

Рекомендовано до друку: В.В.Мартиненко / Recommended for publishing by: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 14.01.2010.

© I.I.Самченко, В.В.Сирота, В.В.Кирошка, Т.П.Бондаренко, 2010

© I.I.Samchenko, V.V.Sirota, V.V.Kiroshka, T.P.Bondarenko, 2010