

Ю. А. Гриневич, Т. В. Ельщик

immune response in hypothalamic — Arch. Allergy Appl. Immunol., 1971,

uring immunization.— Abstr. Commun. 4, p. 302—309.

ic Deniel E. G. Effect of changing in the rat.— Horm. Metab. Res., 1972, 4,

L. Inhibition of in vitro lymphokine 1975, 1115, p. 476—480.

ulation altered by trypsin.— Science,

M. Effect of HCG on antibody pro-

—13.

Поступила в редакцию
16. I 1980 г.

МЕТОДИКА

УДК 616—056.3.001.6

Э. В. Гюллинг, М. Б. Самбур

О ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ И ОЦЕНКЕ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА IN VIVO

При изучении патогенеза аллергических заболеваний и экспериментальной разработке методов десенсибилизирующей терапии широко используются разнообразные способы воспроизведения и оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) *in vivo*. Моделируют их обычно парентеральным введением аллергенов различного происхождения предварительно сенсибилизированным животным. Выраженность аллергической реакции при этом, в зависимости от условий опыта, определяется по гиперемии и отеку кожи и слизистых оболочек, увеличению объема и (или) веса органов (ушных раковин, лап), в которые вводят разрешающую дозу антигена. Указанные способы имеют, однако, ряд существенных недостатков. Показано [5], что различные проявления ГЗТ в нелимфоидных тканях и органах не всегда надежно отражают состояние сенсибилизации лимфоидных клеток. Например мыши, инфицируемые большими дозами БЦЖ, почти не реагируют на введение туберкулина в подушечку лапы, в то время как клетки селезенки таких животных сохраняют способность передавать ГЗТ нормальным мышам. Кроме того, интенсивность аллергического воспаления, особенно в покровных тканях, зависит не только от выраженности ГЗТ, но и от флогогенных свойств аллергена, исходного состояния вазомоторов, проницаемости сосудов и некоторых других неспецифических факторов.

Чтобы уменьшить неспецифическое повреждающее действие антигенов в последние годы вместо микроорганизмов и полученных из них препаратов для воспроизведения ГЗТ используют чужеродные эритроциты [1,3—7]. Для сенсибилизации животным (мыши, крысы) вводят 10^6 — 10^8 эритроцитов барана (ЭБ). Разрешающую дозу (10^8 ЭБ) инъецируют через 4 сут в подушечку одной из задних лап, в другую (контрольную) лапу вводят физиологический раствор. Выраженность ГЗТ учитывают через 24 ч по разнице в массе ампутированных опытных и контрольных лап животных, выраженной в процентах по отношению к контролю: При такой постановке экспериментов, как свидетельствуют литературные данные [1, 4], масса опытных лап достоверно превышает массу контрольных, что было подтверждено и нашими экспериментами (табл. 1). В то же время из приведенных в таблице данных следует, что гетероэритроциты индуцируют весьма слабо выраженную реакцию, а способ ее оценки недостаточно надежен вследствие возможных субъективных ошибок при определении уровня ампутации стоп. Так как разрешающая доза чужеродных клеток (10^8) настолько велика, что вероятно изменение массы конечности за счет первичной иммунной реакции, сомнительной также является правомочность использования в контроле физиологического раствора.

Нами разработан более эффективный способ моделирования ГЗТ, при котором вместо эритроцитов в качестве аллергена используются лимфоциты, обладающие, как показали эксперименты, проведенные на различных животных и добровольцах, высокой сенсибилизирующей активностью [6]. Поскольку основное количество сенсибилизированных лимфоцитов сосредоточено в регионарных лимфоидных органах, чтобы обеспечить адекватность и повысить точность оценки индуцируемого аллергического процесса, интенсивность его определяли по разнице в массе регионарных подколенных лимфоузлов опытной и контрольной конечностей через 24 ч после введения в подушечки лап сенсибилизированных животных соответственно специфического и неспецифического антигена (убитых прогреванием тимоцитов различных видов животных).

Способ моделирования ГЗТ у мышей осуществляется следующим образом. Животным массой 20—25 г в подушечки обеих задних лап вводят по 0,05 мл 0,9 % раствора хлорида натрия, содержащего 10^4 убитых прогреванием при 56 °С в течение 20 мин тимоцитов крысы (ТК). Через 4 сут в правую заднюю лапу вводят 0,05 мл физиологического раствора, содержащего 10^6 убитых тимоцитов морской свинки (ТМС), а в левую — 0,05 мл, содержащего 10^6 убитых тимоцитов крысы. Через 24 ч мышей забивают и определяют разницу в массе подколенных лимфоузлов, которую выражают в процентах по отношению к массе контрольного правого лимфоузла.

Таблица 1
Выраженность ГЗТ, индуцированной эритроцитами барана

Статистические показатели	Мыши			Крысы		
	Вес стоп, в мг		Разница в массе, в % по отношению к контролю	Вес стоп, в мг		Разница в массе в % по отношению к контролю
	опыт	контроль		опыт	контроль	
<i>M</i>	168,9	144,2	17	1344	1192	13
$\pm m$	5,8	4,5		34,5	32,7	
<i>n</i>	9	9		5	5	
<i>p</i>	<0,01			<0,05		

Результаты экспериментов, проведенных в процессе определения наиболее эффективных схем моделирования ГЗТ и сравнения аллергенных свойств эритроцитов и тимоцитов, представлены в табл. 2, из которой следует, что только у животных IV группы, для моделирования ГЗТ у которых применяли малые количества гетеротимоцитов, масса опытных лимфоузлов с высокой степенью достоверности превышает массу контрольных лимфоузлов. Наиболее существенным отличием морфологических изменений опытных лимфоузлов было сочетание диффузного отека с резко выраженным повсеместным увеличением количества клеток лимфоидного ряда, что характерно для реакции ГЗТ.

При использовании больших доз гетеротимоцитов (III группа) разница в массе опытных и контрольных лимфоузлов значительно уменьшалась, что, по-видимому, обусловлено антигенной перегрузкой. Существенного превышения массы опытных конечностей и лимфоузлов при соблюдении соответствующих контролей не обнаружено также при использовании гетероэритроцитов как в малых, так и в больших дозах, что свидетельствует о том, что они являются слабым аллергеном. У животных всех групп, особенно при применении малых доз клеток, разница в массе опытных лимфоузлов, выраженная в процентах по отношению к контролю, намного превышает определяемую по массе стоп.

Таким образом, наиболее эффективно у мышей ГЗТ воспроизводится с помощью малых доз гетеротимоцитов, а учитывать выраженность реакции целесообразнее всего по приросту массы опытных лимфоузлов.

Для того, чтобы решить, в какой мере определение ГЗТ по предлагаемому способу соответствует результатам тестирования *in vitro*, была сопоставлена динамика развития проявлений ГЗТ по изменению разницы в массе опытного и контрольного лимфоузлов и по показателям реакции торможения миграции макрофагов фактором, образующимся при контакте клеток соответствующих лимфоузлов с убитыми тимоцитами, используемыми для сенсibilизации.

Из представленных в табл. 3 данных следует, что наиболее выражена разница в массе опытных и контрольных лимфоузлов через 24 ч после второго введения гетеротимоцитов ($p < 0,001$); через 48 ч она значительно уменьшается, а через 72 ч уже полностью отсутствует.

О воспроизведении

Аналогичным образом индуцировать фактор, тормозящий миграцию, проведена по [2]. Лимфоузлы, взятые через 24 ч после введения эритроцитов, показали миграцию перитонеальных

Выраженность ГЗТ, воспроизводимая

Группы животных	Сенсибилизация	Разрешающая
I Опыт	10^6 ЭБ	10^8 ЭБ
Контроль	10^6 ЭБ	10^8 ЭМ
II Опыт	10^4 ЭБ	10^8 ЭБ
Контроль	10^4 ЭБ	10^8 ЭМ
III Опыт	10^6 ТК	10^8 ТК
Контроль	10^6 ТК	10^8 ТМ
IV Опыт	10^4 ТК	10^8 ТК
Контроль	10^4 ТК	10^8 ТМ

Примечание. ЭМС — эритроциты крысы, * — $p < 0,02$.

0,47; 0,54. В то же время с увеличением дозы эритроцитов, разрешающей инъекции, показатели миграции (0,3; 0,8; 1,0).

Таким образом динамика миграции макрофагов в лимфоузлах татами тестирования *in vitro*.

Масса лимфоузлов после

Время после второго введения гетеротимоцитов в часах

24

48

72

Разработанный способ также на морских свинках, сенсибилизированных при сенсибилизации тимомы, прогреванием тимомы мышью. Масса опытных лимфоузлов на 84 % превышает массу ко

ствляется следующим образом. Животным вводят по 0,05 мл 0,9 % раствора, нагретым при 56 °С в течение 20 мин. В заднюю лапу вводят 0,05 мл физиологического раствора морской свинки (ТМС), а в переднюю лапу — физиологический раствор крысы. Через 24 ч мышью забирают лимфоузлы, которую выражают в % от массы лимфоузла.

Таблица 1
Эритроцитами барана

Крысы		
Вес стоп, в мг		Разница в массе в % по отношению к контролю
опыт	контроль	
1344	1192	13
34,5	32,7	
5	5	
<0,05		

В процессе определения наиболее эффективных свойств эритроцитов и тимуса, что только у животных IV группы, количество гетеротимочитов, поверхность превышает массу контрольного морфологических изменений тимуса с резко выраженным повсеместно, что характерно для реак-

в (III группа) разница в массе тимуса, что, по-видимому, обусловлена массой опытных конечных контролей не обнаружено так-так и в больших дозах, что свитеном. У животных всех групп, в массе опытных лимфоузлов, тимуса намного превышает определяе-

ГЗТ воспроизводится с помощью в реакции целесообразнее всего

не ГЗТ по предлагаемому способу, была сопоставлена динамика массы опытного и контрольного лимфоузлов фактором, миграции макрофагов фактором, лимфоузлов с убитыми тимочи-

наиболее выражена разница в массе после второго введения гетеротимочитов, а через 72 ч уже пол-

Аналогичным образом изменялась и способность клеток опытных лимфоузлов продуцировать фактор, тормозящий миграцию макрофагов (ФТМ). Реакция торможения миграции проведена по [2]. Супернатант суточных культур клеток опытных лимфоузлов, взятых через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена, отчетливо тормозил миграцию перитонеальных макрофагов. Индексы миграции составили 0,17; 0,31;

Таблица 2
Выраженность ГЗТ, воспроизводимой у мышей при различных условиях эксперимента

Группы животных	Сенсибилизация	Разрешающая доза	Масса подкожных лимфоузлов, в мг	Разница в массе, в % по отношению к контролю	Масса стоп, в мг	Разница в массе, в % по отношению к контролю	Число животных
I Опыт	10 ⁶ ЭБ	10 ⁸ ЭБ	6,6±0,6	6	144,7±4,5	5	10
Контроль	10 ⁶ ЭБ	10 ⁸ ЭМС	6,2±0,4		137,9±5,0		
II Опыт	10 ⁴ ЭБ	10 ⁶ ЭБ	5,2±0,8	13	139,4±3,5	0,2	9
Контроль	10 ⁴ ЭБ	10 ⁶ ЭМС	4,6±0,5		139,2±3,5		
III Опыт	10 ⁶ ТК	10 ⁸ ТК	10,9±0,8	15	155,0±6,3	4	10
Контроль	10 ⁶ ТК	10 ⁸ ТМС	9,5±0,7		149,4±6,0		
IV Опыт	10 ⁴ ТК	10 ⁶ ТК	7,4±0,6*	42	142,9±4,5	3	10
Контроль	10 ⁴ ТК	10 ⁶ ТМС	5,2±0,4		139,0±4,7		

Примечание. ЭМС—эритроциты морской свинки, ЭБ—эритроциты барана, ТК—тимочиты крысы, *— $p < 0,02$.

0,47; 0,54. В то же время супернатант культур клеток, полученных через 72 ч после разрешающей инъекции, практически почти не влияет на миграцию макрофагов (индексы миграции 0,3; 0,8; 1,0).

Таким образом динамика развития ГЗТ, определяемая *in vivo*, совпадает с результатами тестирования *in vitro*.

Таблица 3
Масса лимфоузлов иммунизированных мышей в различные сроки после второго введения гетеротимочитов

Время после второго введения гетеротимочитов, в часах	Масса лимфоузлов, в мг		n
	опыт	контроль	
24	4,79±0,27	3,18±0,16	14
	$p < 0,001$		
48	5,14±0,28	4,0±0,63	7
72	4,07±0,42	4,47±0,42	7

Разработанный способ моделирования и учета ГЗТ с успехом апробирован нами также на морских свинках, которых сенсибилизировали по схеме, идентичной описанной при сенсибилизации мышей. В качестве аллергена при этом использовали убитые прогреванием тимочиты крысы, а в контрольную лапу вводили убитые тимочиты мыши. Масса опытных лимфоузлов морских свинок ($n=7$) составила 22,6±4,1 мг, что на 84 % превышает массу контрольных лимфоузлов (12,3±2,2 мг).

Список литературы

1. Малышев В. А., Давыдова Т. И. Роль низкомолекулярного гуморального фактора тимуса в формировании реакции гиперчувствительности замедленного типа.— Докл. АН УССР, 1976, 5, № 10, с. 928—931.
2. Anders L., Rindfleisch B. Z. Methodische Hinweise zur Durchführung des Makrophagen-Migrationshemmtests.— Zeitschrift für Medizinische Laboratechnik, 1970, 6, N 11, s. 313—317.
3. Askenase P. V., Hayden B., Gershon R. K. Evanescent delayed type hypersensitivity: mediation by effector cells with a short life span.— Journal of Immunology, 1977, 119, N 5, p. 1830—1835.
4. Collins F. M., Morrison N. E. Restoration of delayed hypersensitivity to sheep erythrocytes by thymosin treatment of T-cell-depleted mice.— Infection and Immunity, 1976, 13, N 2, p. 564—568.
5. McGregor D. D., Kostiala A. A. Contemporary topics in immunobiology. New York; London, 1976, 5, ch. 7, p. 237—266.
6. Rapaport F. T., Converse J. M. Human Transplantation. New York; London, 1968, 527 p.
7. Van der Kwast T. H., Olthof J. G., Benner R. Secondary delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in mice; A long-lived memory phenomenon.— Cellular Immunology, 1977, 34, N 2, p. 385—394.
8. Yoshida S. I., Nomoto K., Yamada H., Takaya Himeno K. Comparability of delayed hypersensitivity in various rodents. I. Regulatory mechanisms of delayed footpad reaction in the hamster.— Cellular Immunology, 1977, 34, N 2, p. 231—246.

Киевский институт отоларингологии

Поступила в редакцию
25. V 1979 г.

УДК 612.2:616.24.092

М. М. Филиппов, И. Н. Маньковская, Л. А. Курбаков

ОТКРЫТЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАЗООБМЕНА
У МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Изучение газообмена важно при определении теплопродукции и энергетических затрат организма, калориметрировании питания [1]. Однако при изучении энергообмена у мелких лабораторных животных, особенно при дыхании газовыми смесями с заданным составом, экспериментатор сталкивается с трудностями методического характера.

Известны открытые и закрытые способы непрямого калориметрии по газообмену [3]. Чаще всего с этой целью применяются герметические камеры с периодическим продуванием газовой смесью [4, 5, 7, 9, 10] либо дыхательные маски с клапанными устройствами [2] (с проведением трахеотомии или без нее). Каждый из указанных методических подходов обладает рядом недостатков. Так, при использовании закрытой камеры ограничены возможности проведения хирургических операций (например, катетеризация кровеносных сосудов и др.). Кроме того, чем больше объем камеры, тем больше запаздывание текущего значения газообмена, что часто оказывается весьма важным, в частности при изучении переходных процессов, возникающих в результате резких и частых смен вдыхаемых газовых смесей. Далее, при использовании закрытой камеры не всегда учитывается количество выделенного углекислого газа (обычно он поглощается абсорбентом), что не позволяет определить значения дыхательного коэффициента и подсчет калорического эквивалента потребленного кислорода.

Применение дыхательной маски с клапанами вдоха и выдоха может приводить к увеличению мертвого дыхательного пространства и искажению истинных величин газообмена. Затем, для мелких животных очень сложно изготовить дыхательные клапаны, которые не изменяли бы своих свойств при попадании на них влаги.

Известны попытки применения специального продувочного колпака, надеваемого на голову человека, чаще всего — грудных детей [6, 8], однако данных о приме-

Открытый метод

нении аналогичных устройств в литературе нет.

Предлагается метод, основанный на измерении разницы потоков газа на входе и выходе из камеры, представляющего на рис. 1.

Газовая смесь с известным составом, описанная которой приводится

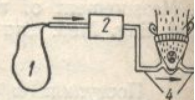


Рис. 1. Схема ме

Рис. 2. Сх

побудителя расхода b через д...
ных порций выдыхаемого воз...
поступает на газоанализатор...
зом, зная скорость воздушно...
центрацию газа после проду...
чество потребленного кислоро...
муле Фика:

$$\dot{V}_{O_2} = \frac{\dot{V} \times F(I - f)}{I}$$

где f — фактор для приведе...

Система регуляции пото...
съемной тонкой трубкой B , за...
сти изменения скорости пото...
том, что при изменении скоро...
 B и системой реометра, чер...
потока.

Моностаб с жидкостью...
лизовать давление газа, соотв...

Дыхательная маска изг...
тического материала (размер...
го) и фиксируется на голове...
маски и плотного обхватываю...

Результаты проведенных...
вотных (крыс) при дыхании...
нием кислорода хорошо совпа...
другими способами. Наладка...

С

1. Витте Н. К., Петрунь Н. М. Медиздат, 1955, 54 с.
2. Лелягина Г. В. Эффектив...
обструкции дыхательных...

7 — Физиологический журнал, № 2