

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ СУБСТРАТА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ КОЖИ СВИНЬИ

Пятницкий Ю.С.

Национальный фармацевтический университет  
Харьков, Украина

**Резюме.** Целью исследования стало изучение иммуотропных свойств субстрата криоконсервированной кожи свиньи (СККС) на мышах с нормальным иммунным статусом и в условиях экспериментальной патологии – контактного дерматита у морских свинок. Установлено, что профилактическое введение СККС животным с нормальным иммунным статусом стимулирует фагоцитарную функцию лимфоцитов, не влияет на антителогенез и угнетает развитие реакции ГЗТ. В условиях аллергического дерматита СККС снижает выраженность воспаления и нормализует уровень иммуноглобулинов. Полученные результаты свидетельствуют об иммуномодулирующих свойствах СККС и обосновывают целесообразность дальнейшего изучения препарата с целью создания высокоэффективного противоаллергического средства для патогенетической терапии аллергодерматитов.

**Ключевые слова:** пероральная иммунологическая толерантность, субстрат криоконсервированной кожи свиньи, противовоспалительные, иммуномоделирующие свойства.

## EXPERIMENTAL RESEARCH OF THE IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF THE CRYOPRESERVED PIG SKIN SUBSTRATE

Pyatnitsky Y.S.

National University of Pharmacy  
Kharkov, Ukraine

**Resume.** The objective of this research has been the study of immunotropic properties of the cryopreserved pig substrate (CPSS) in guinea pig in the experimental pathology, such as a contact dermatitis guinea pigs. The guinea pigs had a normal immune status. It has been defined, that prophylactic administration of CPSS to animals stimulates the phagocytic function of lymphocytes, has no effect on antibody response and inhibits the growth of DTH reaction. In terms of allergic dermatitis CPSS decreases the severity of inflammation and normalizes the level of immunoglobulins. These results indicate immunomodulatory properties of CPSS and make it appropriate for further study to create anti-allergic agent for highly pathogenic therapy of allergic dermatitis.

**Keywords:** oral immune tolerance, cryopreserved pig skin substrate, anti-inflammatory, immunomodulatory properties.

**Введение.** Неуклонный рост больных аллергией за последние десятилетия позволяет говорить о пандемии этого заболевания. Несмотря на достаточно широкий арсенал противоаллергических фармакологических средств проблема разработки рациональных и безопасных мер для терапии аллергических заболеваний остается нерешенной. В настоящее время, наиболее патогенетическим лечебным мероприятием аллергических состояний является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) и ее разновидностью является пероральная иммунотерапия (ПИТ) [1], суть которой состоит в том, что при контакте определенного или гомологичного по структуре АГ с иммунной системой, ассоциированной с желудком и кишечником (GALT) развивается совместная супрессия клеточного и гуморального иммунитета. С позиций ПИТ перспективным направлением является использование препаратов на основе структурных белков животного происхождения. Одним из таких препаратов является субстрат криоконсерви-

рованной кожи свиньи (СККС). Теоретически, пероральное поступление СККС как источника антигенов (клеточных элементов кожи свиньи (эластиновых, ретикулярных, коллагеновых волокон соединительной ткани дермы), будет способствовать формированию у больных аллергодерматитом состояния активной иммунологической ареактивности к антигенам кожи [2].

**Целью** данной работы стало изучение иммуотропных свойств СКШС на мышах с нормальным иммунным статусом и в условиях экспериментальной патологии – контактного дерматита у морских свинок.

**Материалы и методы.** Исследования проведены с соблюдением правил «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986) [3]. Содержание животных во время проведения эксперимента соответствовало действующим нормам.

Влияние СКШС на состояние неспецифического иммунитета оценивали по динамике

процесса фагоцитоза нейтрофилами частиц латекса после их совместной инкубации в течение 5, 30 и 60 мин при  $t 37^{\circ}$ . Определяли показатели: фагоцитарный индекс (FI) – на 100 клеток подсчитывали процент фагоцитирующих клеток; фагоцитарное число (FU) – среднее количество частиц латекса, поглощенного одним нейтрофилом [4].

Для изучения влияния СККС на гуморальный иммунитет мышам предварительно в течение 2-х недель и весь период иммунизации вводили внутрижелудочно изучаемое вещество в дозе 200 мг/кг. Животным контрольной группы вводили воду. Мышей иммунизировали однократным внутрибрюшинным введением 3% суспензии эритроцитов барана (ЭБ) в дозе 0,2 мл/20 г массы тела животного. Определение количества антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле [5] и титров гемагглютининов (ГА) и гемолизиров (ГЛ) в сыворотке крови мышей, по реакции агглютинации [6], проводили на 5-е сутки после иммунизации ЭБ.

Состояние клеточного иммунитета на фоне применения препарата определяли в тесте гиперчувствительности замедленного типа, по методу К.Р. Kitamura [7]. Исследуемое вещество, животным вводили по схеме, приведенной выше. Мышей иммунизировали однократным внутрибрюшинно введением суспензии ЭБ в дозе  $2 \cdot 10^5$  клеток/мл в объеме 0,5 мл раствора Хэнкса на 20 г массы тела. Разрешающую дозу ЭБ вводили под апоневротическую пластинку одной из задних конечностей мышей на 5-е сутки (опыт). В контралатеральную лапу вводили физиологический раствор в том же объеме (контроль). Оценку местной реакции проводили через 24 часа, рассчитывая индекс реакции (ИР) по формуле: 
$$ИР = (M_{\text{опыт}} - M_{\text{контроль}}) / M_{\text{контроль}} \times 100 \%$$
 где  $M_{\text{опыт}}$  – масса опытной лапы;  $M_{\text{контроль}}$  – масса контрольной лапы.

Влияние СККС на образование иммуноглобулинов изучали на модели аллергического контактного дерматита (АКД) у морских свинок, вызванного 5% раствором 2,4-динитрохлорбензолом (ДНХБ) по методике Залкан П.М. и Ивлевой Е.А. [8]. Разрешающую дозу вводили на 21-й день. На 22-е и 26-е сутки от начала опыта у животных внутрисердечно собирали кровь для определения уровня иммуноглобулинов А, М, G и содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) [9].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали параметрическими (критерий Ньюмана-Кейлса) и непараметрическими (критерий Вилкоксона Манна-Уитни) методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica, v.6,0». Различия между контрольными и опытными группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** На первом этапе изучали влияние СККС на фагоцитарную функцию нейтрофилов (ФАН), поскольку в формировании ПИТ значительную роль играют фагоциты, осуществляя презентацию антигена иммунокомпетентным клеткам и элиминацию антигенных фрагментов из организма. Установлено, что введение СККС в дозе 200 мг/кг в течение двух недель существенно повышало фагоцитарную функцию нейтрофилов. Под влиянием СККС достоверно повышались фагоцитарный индекс (FI) и фагоцитарное число (FU), т.е. увеличивалось как количество фагоцитирующих клеток, так и количество поглощенных ими частиц латекса (табл. 1). Причем, если в группе животных интактного контроля максимальная активность наблюдалась на 60-ю минуту инкубации, СККС стимулировал фагоцитоз уже на пятой минуте инкубации: FI был выше чем в группе интактного контроля в 2,6 раза (табл. 1). Таким образом, введение СКШС способствовало повышению скорости фагоцитоза.

Профилактическое введение СККС мышам в дозе 200 мг/кг не вызывало активации или угнетения антителогенеза, поскольку количество АОК в селезенке и титры ГА и ГЛ в сыворотке крови предварительно иммунизированных мышей не менялись (табл. 2).

При оценке функциональности клеточного иммунитета установлено, что двухнедельное введение СККС мышам в дозе 200 мг/кг приводило к угнетению иммунной реакции, индуцированной введением тимусзависимым антигеном ЭБ: индекс реакции в этой группе был достоверно ниже значений иммунизированного контроля и не отличался от ИР, зафиксированного в группе интактных животных (табл. 3).

Целью следующего фрагмента работы стало изучение иммуотропных свойств СККС в условиях аллергического контактного дерматита (АКД) у морских свинок, индуцированного ДНХБ, который при нанесении на кожу провоцирует развитие аллергической реакции, адекват-

Таблица 1  
Изучение биологической активности СККС в тесте фагоцитарной активности нейтрофилов

Группы животных	5 мин. инкубации			30 мин. инкубации			60 мин. инкубации		
	FI	FU	IFI	FI	FU	IFI	FI	FU	IFI
Интактный контроль	6 (5; 7)	3,5 (3,2; 4,1)	0,16 (0,14; 0,29)	30,0 (28,0; 35,0)	4,5 (4,3; 4,9)	1,33 (1,3; 1,5)	46,0 (38,0; 51,0)	6,04 (5,2; 6,6)	2,78 (2,57; 3,22)
СККС, 200 мг/кг	15,5* (9; 19)	3,8 (3,3; 4,1)	0,62* (0,33; 0,73)	42,0* (38,5; 47,5)	5,8* (4,7; 6,5)	2,5* (2,1; 2,9)	59,0 (44,0; 66,5)	6,8 (5,5; 7,6)	4,51 (2,43; 5,12)
Тималин, 3,6 мг/кг	6 (5; 12)	3,3 (2,8; 4,8)	0,29 (0,14; 0,40)	38,0* (31,0; 45,0)	5,7* (5,6; 6,7)	2,5* (1,8; 2,5)	52,5 (45,0; 61,0)	5,6* (4,4; 6,4)	3,05* (2,4; 3,8)

Примечания: \* – отличия достоверны по отношению к интактному контролю,  
p<0,05;

n=6-10 – количество животных в группах.

Таблица 2

Влияние СККС на гуморальный иммунитет мышей (*Me* (Q25; Q75))

Группы животных	n	Количество АОК (на селезенку)	Титры ГА, $Log_2$	Титры ГЛ, $Log_2$
Иммунизированный контроль (ЕБ)	8	8340 (6480; 11360)	7 (6; 8,5)	11 (10; 11)
СККС, 200 мг/кг	8	6760 (3960; 8560)	9,5 (8; 10)	9 (8,5; 11)

Примечание. \* – отличия достоверны по отношению к иммунизированному контролю,  $p < 0,05$

Таблица 3

Влияние СККС на клеточный иммунитет мышей (=10)

Группы животных	n	Дозы, мг/кг	Индекс реакции ( <i>Me</i> (Q25; Q75))
Интактный контроль	10	–	5,5 (4,5; 5,6)
Иммунизированный контроль (ЕБ)	10	–	11,7 (9,4; 12,3)*
СККС	10	200	6,5 (3,6; 8,5)**

Примечания. \* – отличия достоверны по отношению к интактному контролю,  $p < 0,05$ ;

\*\* – отличия достоверны по отношению к иммунизированному контролю,  $p < 0,05$ .

Таблица 4

Влияние СККС на уровень иммуноглобулинов в крови морских свинок с аллергическим контактным дерматитом, вызванным ДНХБ (*Mean*±*St.err.*)

Группы животных	n	Срок наблюдения, дни	Уровень иммуноглобулинов, г/л			
			Ig A	Ig M	Ig G	ЦИК, ум. од.
Интактный контроль	10	22	0,13±0,04	0,80±0,10	1,24±0,03	9,83±1,97
		26				
Позитивный контроль	8	22	0,61±0,07*	1,14±0,15	2,31±0,16	24,14±2,95
		26	0,77±0,12*	0,79±0,19	2,22±0,16	32,01±3,15
СККС, 200 мг/кг	12	22	0,18±0,02#	0,42±0,06	1,46±0,03	11,20±0,70
		26	0,213±0,02#	0,58±0,11	1,70±0,10	10,60±0,8

Примечания. \* – отличия достоверны по отношению к интактному контролю,  $p < 0,05$ ;

# – отличия достоверны по отношению к позитивному контролю (ДНХБ),  $p < 0,05$ ;

ватной основным клиническим проявлениям аллергодерматита у человека [8].

Установлено, что нанесение завершающей аппликации ДНХБ на интактный участок кожи животных вызвало развитие аллергического воспаления. На месте нанесения аллергена наблюдали отек тканей, гиперемию с явлениями геморрагий и выраженной инфильтрацией, у некоторых животных образовывались геморрагические язвы с корками. В крови достоверно

повышались уровни иммуноглобулинов А, М, G и циркулирующих иммунных комплексов соответственно в 4,7; 1,4; 1,9 раза на 22-е сутки наблюдения, которые продолжали расти (табл. 4). Уровень Ig M на 26 сутки возвращался к исходному уровню интактных животных (табл. 4). Повышенное содержание ЦИК в группе животных с аллергодерматозом на 26-е сутки наблюдения подтверждает развитие иммунопатологических реакций как следствие сенсibilизации ДНХБ.

Образовавшиеся комплексы антиген-антитело активируют комплемент, усиливают хемотаксис нейтрофилов, высвобождают кинины, простагландины и другие медиаторы, которые индуцируют воспалительную реакцию [10]. По данным литературы признаком нарушения функциональной активности иммунной системы в условиях АКД, вызванного ДНХБ, является снижение уровня Ig A, основного иммуноглобулина, связывающего антигены, попадающие через кожные покровы [10]. В нашем опыте уровень Ig A и G, наоборот, повышается, что свидетельствует об усилении антителообразования с целью инактивации антигена и ускорения его элиминации. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существенном нарушении иммунитета животных с аллергодерматитом.

Введение СККС на протяжении всего срока сенсибилизации и после разрешающей аппликации аллергена способствовало снижению как выраженности АКД (существенно снижалась гиперемия и отечность тканей) так и нормализации уровня сывороточных Ig A, M, G и ЦИК.

Известно, что развитие АКД протекает по механизму реакции ГЗТ, в основе которой лежит сенсибилизация Т-лимфоцитов хелперов первого типа (Th1) антигеном. После первого контакта с антигеном увеличивается количество сенсибилизированных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, часть из которых является Т-лимфоцитами памяти. Повторное попадание антигена в организм происходит активация Th1, которые выделяют цитокины клеточного иммунитета – INF- $\gamma$ , IL-2, IL-12 [11].

На основании полученных данных можно предположить, что пероральное введение СККС животным в дозе 200 мг/кг как мышам с нормальным иммунным статусом так и морским свинкам с аллергодерматозом стимулирует образование специфических, по отношению к антигенным детерминантам, Т-клеток памяти, а также зрелых эффекторных Th1 и Th2 лимфоцитов [11]. После повторного контакта организма с антигеном зрелые Th1 (лимфоциты воспаления), активируют макрофаги к внутриклеточному перевариванию, и образуют хемоаттрактанты, стимулирующие попадание макрофагов, нейтрофилов и других клеток воспаления из кровотока в очаг воспаления, которые, в свою очередь, высвобождают неспецифические медиаторы воспаления. В результате указанных процессов происходит снижение выраженности воспаления в месте повторного введения антигена и обеспечи-

вается эффективная защита от антигенного воздействия. В пользу этого предположения также свидетельствуют данные о стимулирующем влиянии СККС на фагоцитарную функцию нейтрофилов и угнетающем влиянии на развитие реакции ГЗТ у нормальных животных.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что профилактическое введение СККС животным с нормальным иммунным статусом стимулирует фагоцитарную функцию лимфоцитов, не влияет на антителогенез и угнетает развитие реакции ГЗТ. В условиях аллергического дерматита СККС снижает выраженность воспаления и нормализует уровень иммуноглобулинов. Полученные результаты свидетельствуют об иммуномодулирующих свойствах СККС и обосновывают целесообразность дальнейшего изучения препарата с целью создания высокоэффективного противоаллергического средства для патогенетической терапии аллергодерматитов.

## Литература:

1. I.V. Корицька Алергія та алерген-специфічна імунотерапія. Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. № 4 (63) 2013. – С 73-74.
2. Leonard SA, Martos G, Wang W, Nowak-Węgrzyn A, Berin MC. Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2012. – V. 129, № 6. – P. 1579-1587
3. Надлежащая производственная практика лекарственных средств // Под.ред. Н.А.Ляпунова, В.А.Загоря, В.П.Георгиевского, Е.П.Безуглой. – К.:МОРИОН, 1999. – С.508-545.
4. Гордиенко Г.И., Бородин Т.М., Дудина Т.А., Самсыгина Г.А. Способ исследования поглотительной и метаболической активности нейтрофилов периферической крови методами фагоцитоза и НСТ-теста // *Педиатрия.* – 2003. – № 5. – С 1-3.
5. Ierne K.N., Nordin A.A. Plaque formation by single antibody – producing cells // *Science.* – 1963. – V. 140. – P. 405-406.
6. Иммунологические методы // Под ред. Х.Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
7. Kitamura K. A Foodpad weigh assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse // *J. Immunol. Methods.* – 1980. – V. 39. – P. 277-283.
8. Залкан П.М., Иевлева Е.А. Экспериментальная модель аллергического дерматита. В кн. Актуальные вопросы профессиональной дерматологии. – М., – 1965. – 106 с.
9. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под. ред. Меньшикова В.В. – Медицина, 1987. – 368 с.
10. Кожа (строение, функция, общая патология и терапия) / Под ред. А.М. Чернуха Е.П., Фролова М.: Медицина, 1982. – 335 с.
11. А. Ройт. Основы иммунологии. Пер. с англ. – М: Мир. 1991. – С. 236-238.