

УДК: 615.014:616-056.3-085

DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2019.02.064>**ВИВЧЕННЯ АЛЕРГОПОТЕНЦІАЛУ БІОПРЕПАРАТІВ САНЕКС****Туркіна В.А., Грушка О.І., Альохіна Т.А.**

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Центральна науково-дослідна лабораторія та лабораторія промислової токсикології (зав. - к.біол.наук., Зазуляк Т.С.)

Реферат

Мета. Експериментально дослідити алергонебезпеку побутових біопрепаратів САНЕКС виготовлених на основі ензимів, виробництва Nviron Biosolutions Incorporation, Канада.

Матеріал і методи. Вивчали імунотоксичний вплив біопрепаратів САНЕКС: Антисапах концентрат і Антитабак в розчині. Дослідження препаратів проводили на базі центральної науково-дослідної лабораторії та лабораторії промислової токсикології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. В експеримент брали нелінійних білих щурів-самок масою 175-210 г. В експериментах проведено сенсibilізацію шляхом одноразового інгаляційного введення 0,25 см³ препарату. Ступінь сенсibilізації встановлювали за результатами тестів *in vivo* та *in vitro*. Вірогідність отриманих змін оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати й обговорення. Інгаляційна сенсibilізація біопрепаратами викликала зміни у лейкоцитарній формулі у піддослідних тварин (білих щурів-самок). Вміст еритроцитів та масова концентрація гемоглобіну білих щурів, які сенсibilізовані препаратами Антисапах і Антитабак, вірогідно зменшені. В лейкоцитарній формулі піддослідних тварин відмічається вірогідне збільшення вмісту еозинофілів. В тестах *in vitro*, виявлено вірогідне посилення реакції специфічного лізису лейкоцитів та реакції специфічної агрегації лейкоцитів при розведенні 1:10. Серед досліджених показників клітинного імунітету у експериментальних тварин вірогідних змін не виявлено, тільки у тварин, які сенсibilізовані біопрепаратом Антисапах відмічено вірогідне збільшення вмісту цитотоксичних лімфоцитів (CD8). Значення імунорегуляторного індексу вірогідно зменшилось у тварин сенсibilізованих біопрепаратом Антитабак.

Висновки. Біопрепарати Антитабак в розчині і Антисапах концентрат можуть призвести до розвитку анемії у експериментальних тварин при інгаляційному впливі. Досліджені біопрепарати володіють помірним алергопотенціалом.

Ключові слова: сенсibilізація, біопрепарати, алергопотенціал

Abstract

STUDY OF THE ALLERGIC POTENTIAL OF BIOPREPARATE SANEX

TURKINA V.A., HRUSHKA O.I., ALYOKHINA T.A.

The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

Central Research Laboratory and Laboratory of Industrial Toxicology

Aim. The purpose of our research was to experimentally investigate the allergenicity of SANEX household biomaterials based on enzymes manufactured by Nviron Biosolutions Incorporation, Canada.

Material and Methods. The immune toxic effects of SANEX biopreparations were studied: Antiseptic concentrate and Antitabac in solution. Drug investigations were conducted at the Central Research Laboratory and Laboratory of Industrial Toxicology of the Danylo Halytsky National Medical University in Lviv. Nonlinear white female rats weighing 175-210 g were used in the study. In the experiments, sensitization was performed by a single inhalation injection of 0.25 cm³ of the drug. The degree of sensitization was determined by *in vivo* and *in vitro* tests. Reliability of the obtained changes was estimated using the Student's t-criterion.

Results and Discussion. Inhalation sensitization with biological preparations caused changes in the leukocyte formula in experimental animals (white rats females). The content of erythrocytes and the mass concentration of hemoglobin of white rats sensitized with preparations Antitabac and Antiseptic was significantly reduced. In the leukocyte formula of the experimental animals, a significant increase in the content of eosinophils was noted. In *in vitro* tests, a significant enhancement of the reaction of specific lysis of leukocytes and the reaction of specific agglomeration of leukocytes was revealed at a dilution of 1:10. Among the studied parameters of cellular immunity in the experimental animals, no significant changes were found; only in animals sensitized with the Antiseptic biological preparation, there was a significant increase in the cytotoxic lymphocyte content (CD8). The value of the immunoregulatory index was significantly decreased in animals sensitized by the biological preparation of Antitabac.

Conclusions. Biopreparations Antitabac in solution and Antiseptic concentrate can lead to the development of anemia in experimental animals with inhalation effects. The studied Biopreparations have a moderate allergogenic potential.

Key words: sensitization, biopreparations, allergopotential

Вступ

Важливим завданням сучасної біотехнології є розробка наукових основ та інженерних рішень для одержання продуктів, що мають широкі перспективи практичного використання.

Одне з провідних місць серед них належить ферментам мікробного походження, які застосовують у різних галузях промисловості та господарства.

Японський професор Теруо Хіга об'єднав різні культури мікроорганізмів у ефективні мікроорганізми (ЕМ), до яких увійшло понад 80 штамів із 10 родів і 5 родин (фотосинтетичні бактерії, молочнокислі бактерії, дріжджі, актиноміцети, ферментувальні гриби). Вони об'єднують усі відомі метаболічні особливості мікроорганізмів: біоценози, які розвиваються в анаеробних і аеробних умовах, із гетеротрофними та автотрофними типами живлення, із симбіотичними чи метабіотичними зв'язками [1, 3], вони під дією амілази розкладають крохмаль, протеази - білки, целюлази - целюлозу, кератинази - кератин, ліпази - жири [6]. Вибір даної технології визначається її особливістю, оскільки вона є стійкою асоціацією аеробних та анаеробних мікроорганізмів, які співіснують в одному середовищі в режимі активного взаємообміну джерелами живлення, продукти життєдіяльності однієї групи необхідні для іншої, при цьому відбувається акумуляція позитивних властивостей об'єднаних систем мікроорганізмів. Деякі анаеробні представники ЕМ здатні переходити з одного метаболічного процесу на інший (з анаеробного дихання на аеробне), їх умовно відносять до факультативних анаеробів (більшість представників дріжджів). Інші не здатні змінювати тип дихання, але не гинуть за присутності молекулярного кисню, їх відносять до групи аеротолерантних анаеробів (молочнокислі бактерії).

У процесі життєдіяльності ЕМ продукують біофунгіциди, які пригнічують розвиток патогенних організмів. Здатність ЕМ виробляти різноманітні ферменти пояснює їх високу адаптованість до різних концентрацій забруднень, присутніх у стічних водах. Поступове введення речовин за певних концентрацій, що зазвичай інгібують ферментативну активність клітин, дає змогу адаптуватися їм до нових умов і пояснює постійне розширення області застосування ЕМ. Ця технологія

визнана та впроваджується в Індонезії, Кореї, Тайвані, Пакистані, Індії, Китаї, Аргентині, США, Франції, Німеччині, Іспанії, Португалії та інших країнах. В Канаді, на виробництві Nviron Biosolutions Inc., розроблені такі біопрепарати САНЕКС: Антизапах концентрат і Антитабак в розчині, які приготовлені на основі ензимів.

Мета дослідження - експериментально дослідити алергонебезпеку біопрепаратів САНЕКС.

Матеріал і методи

Вивчали імунотоксичний вплив біопрепаратів САНЕКС: Антизапах концентрат і Антитабак в розчині, виробництва Nviron Biosolutions Inc., Канада. Біопрепарати САНЕКС виготовлені на основі ензимів. Антизапах концентрат використовується для усунення неприємного запаху органічного походження, екологічне очищення будь-яких поверхонь та видалення запаху в побуті, в пральнях, залах для фітнесу, роздягальнях, готелях та ресторанах. Перед застосуванням Антизапах концентрат рекомендують змішати з водою у пропорції 1:10, добре перемішати. Приготовлений розчин використовують одноразово, зберіганню не підлягає. Антитабак в розчині використовується для усунення запаху нікотину в приміщенні, салоні автомобіля, на одязі та тканинах. Рекомендується проводити обробку приміщень 2-3 рази на тиждень, при цьому потрібно уникати надмірного вдихання препарату і контакту зі шкірою і виключати контакт з очима.

Встановлення алергенних властивостей біопрепаратів САНЕКС проводили на базі ЦНДЛ та лабораторії промислової токсикології ЛНМУ імені Данила Галицького.

Для експерименту брали 30 білих безпородних щурів-самиць віком 3-3,5 місяці і масою тіла 180-200 г, які утримувались у віварії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького при температурі 19,0-20,50С в умовах природного світлового циклу на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води та їжі.

Під час проведення досліджень на тваринах дотримувались принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей" (Страсбург, 1986 р.) та "Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах".

Методом "сліпого ранжування" тварин було відібрано три групи білих щурів-самок по 10 тварин у кожній: 1а група - контрольна; 2а група - сенсibilізована біопрепаратом Антитабак в розчині; 3а група - сенсibilізована біопрепаратом Антизапах концентрат у розведенні 1:10 фізрозчином. Сенсibilізацію проводили одноразовим інгаляційним введенням препарату 0,25 см³ [5]. Через 5 днів проводили забір крові.

Вивчали зміни показників периферичної крові (еритроцити, гемоглобін, лейкоцити та лейкоцитарна формула) [4], окрім цього для кількісної оцінки сенсibilізації використовували метод з виявлення реакції клітин крові на алерген "in vitro" - реакцію специфічної агломерації лейкоцитів (РСАЛ) і реакцію специфічного лізису лейкоцитів (РСЛЛ) [7]. Дані тести дають можливість виявити алергічну реакцію сповільненого типу.

Стан імунологічної реактивності організму оцінювали за відносним вмістом в периферичній крові субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів СД3 (Т-лімфоцити), СД4 (Т-хелпери), СД8 (Т-цитотоксичні), СД16 (натуральні кілери), СД22

(В-лімфоцити), а також співвідношення CD4/CD8. Дослідження проводили з використанням діагностикумів еритроцитарних (виробництва ТОВ НВЛ "Гранум", Україна, м. Харків).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету програми Microsoft Excel. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення (М) та стандартної похибки. Вірогідність отриманих змін порівняльних величин оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента. За вірогідні приймали зміни з рівнем значимості більш, ніж 95% (p<0,05) [2].

Результати й обговорення

Після забору крові визначали гематологічні показники, стан клітинного імунітету та проводили алерготести in vitro.

Вміст еритроцитів білих щурів, які сенсibilізовані Антитабак (темп.=2,2; 3,77±0,70), Антизапах (темп.=6,2; 3,17±0,52), вірогідно зменшений порівняно з контрольною групою (4,28±0,25). Масова концентрація гемоглобіну також вірогідно зменшена відповідно (темп.=2,1; 131,37±12,91) і (темп.=4,4; 123,39±9,74) порівняно з контролем (141,47±8,72). Значення відсоткового вмісту формених елементів крові у сенсibilізованих тварин в порівнянні з показниками контрольних тварин вірогідно не змінилися, крім вірогідного збільшення вмісту еозинофілів: Антитабак (темп.=3,3; 3,40±0,97), Антизапах (темп.=2,3; 3,0±1,05) порівняно з контрольною групою (2,0±0,94) (табл. 1).

Реакції лейколізису (РСЛЛ) і агломерація лейкоцитів (РСАЛ) при розведенні 1:10

Таблиця 1

Показники периферичної крові білих щурів-самок після одноразової сенсibilізації біопрепаратами САНЕКС (p≤0,05, t критичне=2,1)

Показники	Контроль	Антитабак	темп.	Антизапах	темп.
Еритроцити, x10 ¹²	4,28±0,25	3,77±0,70	2,2*	3,17±0,52	6,2*
Гемоглобін, г/л	141,47±8,72	131,37±12,91	2,1*	123,39±9,74	4,4*
Лейкоцити, X10 ⁹	9,56±1,33	9,95±1,72	0,6	9,79±1,15	0,4
Лейкоформула:					
Базофіли, %	0,3±0,48	0,4±0,52	0,5	0,4±0,52	0,5
Еозинофіли, %	2,0±0,94	3,40±0,97	3,3*	3,0±1,05	2,3*
Нейтрофіли, %	22,8±3,97	23,8±3,58	0,6	21,7±3,02	0,7
Моноцити, %	2,8±0,63	2,8±0,63	0	2,7±0,67	0,3
Лімфоцити, %	71,9±4,75	69,6±3,78	1,2	71,2±4,78	0,3

*t - коефіцієнт Стьюдента, при t>2,1 вірогідні зміни (p<0,05)

Таблиця 2

Результати алерготестів *in vitro* у білих щурів, сенсibilізованих біопрепаратами САНЕКС
($p \leq 0,05$, t критичне=2,1)

Показники	Контроль	Анти табак	темп.	Антизапах	темп.
РСЛЛ, % розведення 1:10	7,205±2,95	13,83±5,00	4,8*	12,65±6,83	2,4*
РСЛЛ, % розведення 1:100	7,205±2,95	8,06±2,20	0,4	6,26±2,60	0,8
РСАЛ, розведення 1:10	1,35±0,10	2,63±1,24	3,3*	2,55±0,43	9,2*
РСАЛ, розведення 1:100	1,35±0,10	1,40±0,13	1,0	1,47±0,19	2,0

* t - коефіцієнт Стьюдента, при $t > 2,1$ вірогідні зміни ($p < 0,05$)

Таблиця 3

Показники клітинного імунітету в білих щурів, сенсibilізованих біопрепаратами САНЕКС
($p \leq 0,05$, t критичне=2,1)

Показники	Контроль	Анти табак	темп.	Антизапах	темп.
СД3, %	49,8±4,05	48,90±3,25	0,5	50,7±2,75	0,6
СД4, %	31,1±3,63	28,0±4,19	1,8	29,9±3,98	0,7
СД8, %	18,7±2,31	20,9±3,00	1,8	20,8±2,25	2,1*
СД16, %	14,7±2,31	15,2±3,26	0,4	15,3±2,31	0,6
СД22, %	19,1±3,63	21,4±2,41	1,7	19,6±2,5	0,4
Імунорегуляторний індекс (ІРІ)	1,69±0,30	1,38±0,33	2,2*	1,47±0,35	1,6

* t - коефіцієнт Стьюдента, при $t > 2,1$ вірогідні зміни ($p < 0,05$)

дали вірогідні зміни у сенсibilізованих тварин: РСЛЛ - Анти табак (темп.=4,8; 13,83±5,00), Антизапах (темп.=2,4; 12,65±6,83), контроль (7,205±2,95); РСАЛ - Анти табак (темп.=3,3; 2,63±1,24), Антизапах (темп.=9,2; 2,55±0,43), контроль (7,205±2,95). При розведенні 1:100 у тестах РСЛЛ і РСАЛ не виявлено вірогідних відмінностей результатів дослідних і контрольної груп (табл. 2). Отримані дані свідчать про розвиток гіперімунної відповіді по комплементзалежному типу алергенного процесу.

Серед досліджених показників клітинного імунітету у тварин експериментальних та контрольної груп вірогідних змін не виявлено, тільки у тварин, які сенсibilізовані біопрепаратом Антизапах відмічено вірогідне збільшення вмісту цитотоксичних лімфоцитів (СД8) (темп.=2,1; 20,8±2,25) у порівнянні з контрольною групою (18,7±2,31). Значення імунорегуляторного індексу (ІРІ) вірогідно зменшилось у дослідних тварин 2-ої групи (Анти табак) (темп.=2,2; 1,38±0,33) порівняно з контролем (табл. 3)

Висновки

1. Отримані дані свідчать проте, що інгаляційний вплив біопрепаратів: Анти табак в розчині і Антизапах концентрат викликав вірогідне зменшення вмісту еритроцитів та гемо-

глобін, яке може призвести до розвитку анемії при контакті з препаратами, а вірогідне збільшення вмісту еозинофілів в лейкоформулі може вказувати на розвиток алергічних реакцій в експериментальних тварин.

2. Одночасно, тести РСЛЛ та РСАЛ при розведенні 1:10, вірогідно відрізнялись у дослідних групах тварин, що свідчить про можливу алергізацію організму під дією біопрепаратів. Вони володіють помірним алергопотенціалом.

Література

1. Blinov V.A., Byrshina V.A., Shapulina Ye. A. Biological effect of effective microorganisms. In.: Kozhevin P.A., eds. Biological substances. Agriculture. Ecology: practice of application. Moscow; 2008. pp. 30-65. Russian (Блинов В. А., Буршина С. Н., Шапулина Е. А. Биологическое действие эффективных микроорганизмов. В кн.: Кожевин П.А., редактор. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: практика применения. М.; 2008. С. 30-65).
2. Glantz Stanton A, Bryan K. Slinker: Primer of Applied Regression and Analysis of Variance. McGraw-Hill, New York 1990, Health Professions Division.
3. Kovalchuk V. A., Kovalchuk O. V., Sameliuk V. I. Biotechnology of sewage treatment of food industry enterprises. Kommunalnoe khoziaistvo horodov 2010; 93: 182-187. Ukrainian (Ковальчук В.А., Ковальчук О.В., Самелюк В.І. Біотехнологія очистки стічних вод підприємств харчової промисловості. Коммунальное хозяйство городов 2010; 93: 182-187).
4. Menshikov V.V., Delektorskaya L.N., Zolotnitskaya R.P. i dr.: Laboratory research methods in the clinic: a Handbook. Moscow: Medicina; 1987. pp. 124-125.

- Russian (Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др.: Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. Москва: Медицина, 1987. - С. 124-125).
5. Requirements for the formulation of experimental studies to substantiate the maximum permissible concentrations of industrial chemical allergens in the air of the working area and atmosphere. МІ 1.1.578 96. Moscow; 1996. pp. 9-10. Russian (Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы. МУ 1.1.578 - 96. М.; 1996. С. 9-10).
 6. Sen Asit K, Mondal Nitya G: Removal and uptake of copper (II) by *Salvinia natans* from wastewater. *Water, Air and Soil Pollut.* 2007, 2, 1-6.
 7. Trahtenberg I. M., Dmitruha N. M., Molozhava O.C. та ін. Violation of the immune status of the human body by the action of chemical factors and methods for their determination: Method. Recommendations. К.: Ukrmedpatentinform, 2007. - 48 p. Ukrainian (Трахтенберг І.М., Дмитруха Н.М., Моложава О.С. та ін. Порушення імунного статусу організму людини за дії хімічних чинників та методи їх визначення: Метод. Рекомендації. - К.: Укрмедпатентінформ, 2007. 48 с.).