

## ОБҐРУНТУВАННЯ КОРЕКЦІЇ ПОРУШЕНЬ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ПРИ ЕНТЕРАЛЬНОМУ ЗАСТОСУВАННІ КРІОКСЕНОДЕРМИ В ДИНАМІЦІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ДЕРМАТИТУ

©Ю. С. П'ятницький, Ю. І. Бондаренко, Г. С. Сатурська

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

**РЕЗЮМЕ.** У статті проведено детальний аналіз можливостей корекції порушень імунної системи шляхом ентерального застосування органопрепарату кріоксендерми при моделюванні експериментального алергічного дерматиту на різних етапах спостереження. Отримано нові дані про позитивний вплив ентерального застосування кріоконсервованої ксеноскіри на функціонування імунної системи при експериментальному алергічному дерматиті, що підтверджується нормалізацією показників гуморального імунітету до 25 доби експерименту.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** кріоксендерма, імунологічна толерантність, експериментальний алергічний дерматит.

**Вступ.** Останнім часом значно розширилися уявлення науковців про патогенез захворювань, в основі розвитку яких закладені механізми зміненої імунологічної реактивності. Не випадково значного науково-практичного і медико-соціального ефекту досягнуто в результаті інноваційної реалізації сучасних технологій виготовлення органопрепаратів на основі природної тваринницької сировини [1, 2]. Серед перспективних органопрепаратів слід вказати ті з них, які спрямовані на ослаблення або усунення найвагоміших ланок патогенезу, особливо тих, що стосуються формування первинного і/або вторинного імунодефіциту у вигляді імунопатологічних уражень шкіри [3].

На сьогодні є достатньо підстав стверджувати, що впровадження в медичну практику сучасних способів корекції імунної резистентності організму на принципово нових методичних засадах пероральної толеративної терапії (oral tolerance therapy) [4, 5] з використанням органопрепаратів на основі структурних білків тваринного походження є перспективним напрямком патогенетичної терапії при імунозалежній патології [3].

Разом з тим, беручи до уваги загальний висновок про імуноотропний характер дії перорально введених в організм чинників біоорганічної природи, наприклад, внаслідок їх імуномодуляторного впливу, залишається в цілому нез'ясованим центральний механізм вказаного впливу. Так, вимагає уточнення питання, чи встановлені при вказаному прийомі ефекти і феномени імунотолорантності є результатом стимулювання клітин імунної системи, чи вони формуються внаслідок ентеральної гіпосенсибілізації імунокомпетентних клітин, зокрема лімфоцитів, які зазвичай здійснюють функцію пристінкового травлення? Відповідь на поставлене питання має принципове значення, оскільки може стати визначальним щодо напрямку формування лікувальної технології на основі принципу толеративної терапії та розвитку відповідного фармацевтичного забезпечення.

Вивчення імунозалежної патології на прикладі експериментальної моделі алергічного дерматиту є дуже перспективним напрямком досліджень, що дозволяє поглиблювати знання про патогенез змін нейрогуморальної та імунної регуляції за даної патології.

**Мета дослідження** – з'ясування особливостей функціонування імунної системи при ентеральному застосуванні кріоксендерми та патогенетичне обґрунтування корекції даним органопрепаратом змін імунологічної реактивності при експериментальному алергічному дерматиті.

**Матеріал і методи дослідження.** Досліди провели на 32 лабораторних білих щурах самцях і самках масою 190–250 г та 18 статевозрілих морських свинках масою 350–400 г. Для експериментального моделювання імунозалежної патології використали модель алергічного контактного дерматиту (АКД), викликаного 5 % розчином 2,4-динітрохлоробензолу [3, 6]. Експериментальний алергічний контактний дерматит як модель реакції уповільненого типу відтворювали у морських свинок. Попередньо тварин сенсibiliзували за методикою Залкан та Івлевої [6]. У якості алергена використовували 2,4-динітрохлорбензол (ДНХБ) у вигляді 5 % спиртово-ацетонового розчину. Вогнище сенсibiliзації формували на ділянці спинки тварини (9 см<sup>2</sup>), з якої попередньо видаляли хутряний покрив. ДНХБ втирали у шкіру спинки 1 раз на добу. Розрішальну дозу ДНХБ наносили на 21 день від початку сенсibiliзації.

Фармакологічну ефективність кріоконсервованої ксенодерми у дозі 200 мг/кг визначали за виразністю антиалергічної дії, яку оцінювали на 21, 22 і 25 доби досліду. У вказані терміни спостереження у крові дослідних тварин визначали рівень імуноглобулінів А, М, G, Е та вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) [7, 8].

Усі експериментальні дослідження та евтаназію тварин проводили з дотриманням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біо-

етики (Київ, 2001) [9]. Статистична обробка результатів виконана у відділі системних статистичних досліджень ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» в програмному пакеті «STATISTIKA» 6.0 («Statsoft», США) з використанням параметричних і непараметричних методів оцінки одержаних даних.

**Результати й обговорення.** Для вивчення патогенетичного впливу ентерального застосування кріоксендерми при різних експериментальних моделях імунозалежної патології насамперед необхідно з'ясувати особливості функціонування імунної системи при потрапленні дослі-

джуваного препарату в організм шляхом ентерального його введення. Для цього першим етапом експериментального дослідження було вивчення місцевої реакції імунної системи у травному тракті інтактних тварин на ентеральне введення кріоксендерми. У слизовій оболонці тонкої кишки інтактних тварин виявлено плазматичні клітини, що здатні синтезувати всі досліджувані класи імуноглобулінів. При цьому спостерігалось найбільше плазмоцитів з Ig A-маркерами (табл. 1), майже удвічі менше було виявлено клітин з Ig M-маркерами, ще рідше виявлялися плазматичні клітини з Ig G-маркерами. У слизовій оболонці кишки виявлено помірну кількість SIg A ( $0,92 \pm 0,02$  г/л).

Таблиця 1. Кількість плазматичних клітин з Ig A, M, G-маркерами на 1 мм<sup>2</sup> слизової оболонки тонкої кишки (M $\pm$ m)

Показник	Група тварин			
	самці		самки	
	контроль (n=8)	кріоксендерма (n=8)	контроль (n=8)	кріоксендерма (n=8)
Плазмоцити з Ig A-маркером	248,7 $\pm$ 8,8	258,6 $\pm$ 8,8	368,1 $\pm$ 5,4	370,1 $\pm$ 6,1
Плазмоцити з Ig M-маркером	139,2 $\pm$ 4,4	141,2 $\pm$ 4,2	168,8 $\pm$ 3,5	171,8 $\pm$ 4,1
Плазмоцити з Ig G-маркером	50,7 $\pm$ 1,6	50,8 $\pm$ 1,7	79,2 $\pm$ 1,2	80,1 $\pm$ 2,1
Вміст SIg A, г/л	0,91 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,02	1,33 $\pm$ 0,06	1,35 $\pm$ 0,06

При порівнянні показників контрольних груп із відповідними показниками тварин при ентеральному введенні кріоксендерми не було виявлено достовірних відмінностей. Це свідчить про відсутність втручання досліджуваного органопрепарату у місцеві імунні реакції здорового організму.

Наступним завданням було дослідження загальної імунної реактивності, зокрема на підставі аналізу основних показників функціонування

імунної системи: рівнів сироваткових імуноглобулінів A, M, G, E та вмісту ЦІК у крові дослідних тварин (табл. 2). При порівнянні досліджуваних показників контрольних груп із відповідними показниками тварин при ентеральному введенні кріоксендерми не виявлено достовірних відмінностей, що підтверджує відсутність системної імунної реакції здорового організму на ентеральне введення кріоксендерми.

Таблиця 2. Показники імунологічної реактивності організму інтактних білих щурів та білих щурів, яким ентерально вводили кріоксендерму (M $\pm$ m)

Показник	Група тварин			
	самці		самки	
	контроль (n=8)	кріоксендерма (n=8)	контроль (n=8)	кріоксендерма (n=8)
ЦІК, ум. од.	51,85 $\pm$ 1,26	54,67 $\pm$ 1,72	67,78 $\pm$ 2,11	68,43 $\pm$ 2,21
Ig A, г/л	0,536 $\pm$ 0,007	0,543 $\pm$ 0,034	0,693 $\pm$ 0,029	0,687 $\pm$ 0,031
Ig M, г/л	0,684 $\pm$ 0,012	0,694 $\pm$ 0,052	0,571 $\pm$ 0,016	0,579 $\pm$ 0,021
Ig G, г/л	0,963 $\pm$ 0,003	0,982 $\pm$ 0,455	0,841 $\pm$ 0,452	0,839 $\pm$ 0,055
Ig E, г/л	0,453 $\pm$ 0,011	0,428 $\pm$ 0,009	0,369 $\pm$ 0,008	0,351 $\pm$ 0,005

Наступне завдання полягало у вивченні особливостей впливу досліджуваного субстрату на окремі показники імунної системи морських свинок за умов експериментального алергічного дерматиту. Дослідження показників гуморального імунітету тварин з алергічним дерматитом на 21-шу, 22-гу і 25-ту доби показало нормалізацію концентрації Ig A під впливом субстрату (табл. 3). Цей показник характеризує вираженість початкових реакцій запального процесу, оскільки здатний першим реагувати на патологічний чинник.

Так, на 21-шу добу дослідження концентрація Ig A була достовірно нижчою на 71,7 %, 22-гу – на 72,9 %, ніж в групі уражених тварин, а на 25-ту добу цей показник достовірно знизився на 72,3 % порівняно з аналогічним показником уражених тварин, і був максимально наближеним до норми.

Аналогічну тенденцію до зниження ми спостерігали при вивченні концентрації Ig M за моделювання АКД. Концентрація Ig M (табл. 4) зазнавала достовірного зниження на 21-шу, 22-гу та 25-гу доби дослідження на 63,5%, на 71,0 % та на 26,5 %

Таблиця 3. Вплив подрібненого субстрату кріоконсервованої шкіри свині на концентрацію імуноглобуліну А у сироватці крові морських свинок з алергічним контактним дерматитом ( $M \pm m$ )

Група тварин	Показник		
	Ig A, г/л		
Контроль (n=6)	0,125 ± 0,039		
Дерматит (n=6)	21-ша доба	22-га доба	25-га доба
	0,605 ± 0,077 $p_1 < 0,001$	0,647 ± 0,047 $p_1 < 0,001$	0,769 ± 0,119 $p_1 < 0,001$
Дерматит + кріоксендерма (n=6)	0,175 ± 0,021 $p_2 < 0,001$	0,175 ± 0,034 $p_2 < 0,001$	0,213 ± 0,021 $p_2 < 0,001$

Примітки: 1.  $p_1$  – різниця достовірна порівняно з контролем; 2.  $p_2$  – різниця достовірна порівняно з групою тварин з алергічним контактним дерматитом.

Таблиця 4. Вплив подрібненого субстрату кріоконсервованої шкіри свині на концентрацію імуноглобуліну М у сироватці крові морських свинок з алергічним контактним дерматитом ( $M \pm m$ )

Група тварин	Показник		
	Ig M, г/л		
Контроль (n=6)	0,796 ± 0,098		
Дерматит (n=6)	21-ша доба	22-га доба	25-га доба
	1,138 ± 0,154 $p_1 < 0,05$	0,966 ± 0,092	0,789 ± 0,187
Дерматит + кріоксендерма (n=6)	0,415 ± 0,059 $p_2 < 0,001$	0,280 ± 0,036 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$	0,580 ± 0,111

відповідно відносно аналогічного показника у групі тварин, яким не проводилась корекція.

Експериментальний алергічний дерматит супроводжувався зростанням концентрації Ig G (табл. 5) в усі терміни спостереження.

Після введення ураженим тваринам подрібненого субстрату консервованої шкіри свині концентрація Ig G достовірно знизилась на 36,7 % на 21-шу добу спостереження, на 33,5 % на 22-ту добу експериментального дослідження та на 23,5 % на

25-ту добу експерименту відносно аналогічного показника у групі тварин без корекції на відповідних етапах спостереження.

Нами спостерігалось достовірне зниження концентрації ЦІК за корекції подрібненим субстратом кріоконсервованої шкіри свині. Аналізуючи дані (табл. 6), можна відмітити значне зниження концентрації ЦІК протягом всього експерименту відносно аналогічного показника у групі тварин з алергічним контактним дерматитом.

Таблиця 5. Вплив подрібненого субстрату консервованої шкіри свині на концентрацію імуноглобуліну G у сироватці крові морських свинок з алергічним контактним дерматитом ( $M \pm m$ )

Група тварин	Показник		
	Ig G, г/л		
Контроль (n=6)	1,242 ± 0,032		
Дерматит (n=6)	21-ша доба	22-га доба	25-га доба
	2,306 ± 0,156 $p_1 < 0,001$	2,022 ± 0,162 $p_1 < 0,001$	2,219 ± 0,159 $p_1 < 0,001$
Дерматит + кріоксендерма (n=6)	1,460 ± 0,034 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	1,345 ± 0,041 $p_2 < 0,001$	1,697 ± 0,103 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Таблиця 6. Вплив подрібненого субстрату консервованої шкіри свині на концентрацію циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові морських свинок з алергічним контактним дерматитом ( $M \pm m$ )

Група тварин	Показник		
	ЦІК, ум.од.		
Контроль (n=6)	9,83 ± 1,97		
Дерматит (n=6)	21-ша доба	22-га доба	25-га доба
	24,14 ± 2,95 $p_1 < 0,001$	25,51 ± 2,51 $p_1 < 0,001$	32,01 ± 3,15 $p_1 < 0,001$
Дерматит + кріоксендерма (n=6)	11,2 ± 0,7 $p_2 < 0,001$	9,1 ± 0,7 $p_2 < 0,001$	10,6 ± 0,8 $p_2 < 0,001$

Результати показали, що на 21-шу та 22-гу доби експериментального дослідження концентрація ЦІК знизилася, відповідно, на 73,6 та 64,3 %, на 25-ту добу даний показник знизившись на 66,9 %, порівняно з показником у групі тварин з алергічним дерматитом без корекції.

**Результати й обговорення.** Виходячи з розуміння того, що важливим чинником лікувальної дії кріоксенодерми є її антигенні властивості [3, 10, 11], які забезпечують здатність її білкових макромолекул вступати в реакції взаємодії із сенсibiliзованими імунними клітинами (макрофагами, нейтрофільними лейкоцитами, лімфоцитами), реакції, що на рівні тканин, органів і цілісного організму реалізується процесами гіпосенсибілізації, отримані результати підтверджують доцільність проведення толеративної терапії при досліджуваній патології. Результати імунологічних досліджень довели, що саме контрольовані реакції АГ-АТ, як відомо, складають патохімічну фазу підосновного механізму феномена толеративної терапії [4, 5].

Ще одним свідченням позитивного впливу толеративної терапії є нормалізація показників гуморальної ланки імунітету та циркулюючих імунних комплексів. Для пояснення цих впливів доцільно використати дані про адсорбентні властивості кріоксенодерми. Адсорбція як процес спонтанного перерозподілу компонентів дисперсної системи між поверхневими шарами і об'ємною фазою має безпосереднє відношення до біологічної активності подрібненої ксеногенної шкіри, оскільки впливає з принципового положення про адсорбцію як процес взаємодії молекул адсорбату з активними центрами поверхні адсорбенту. Процес взаємодії частинок шкіри з інгредієнтами імунних реакцій або активними центрами ферментів, принаймні на початкових стадіях, описується за закономірностями процесу адсорбції. Виходячи з існування двох принципових видів взаємодії адсорбату з адсорбентом, а саме за рахунок дії фізичних сил або в результаті хімічної реакції,

що має місце в умовах пристінкового травлення в кишковому каналі, цілком обґрунтованою постає доцільність дослідження адсорбційної здатності подрібненої ксеношкіри. Оскільки з природи адсорбції, в основі якої лежать процеси хімічної взаємодії у вигляді приєднання атому чи молекули до адсорбента, впливає важлива закономірність щодо існування ефективнішої адсорбції речовин у тріщинах і порах, то значний інтерес викликало питання залежності вказаного явища від рівня дисперсності частинок кріоксенодерми [1, 2].

Дане дослідження підтверджує патогенетичну доцільність використання толеративної терапії (oral tolerance therapy) при імунозалежній патології, ефективною експериментальною моделлю якої є алергічний контактний дерматит.

**Висновки.** 1. Ентеральне застосування кріоксенодерми не здійснює вагомого впливу на загальні та місцеві показники функціонування імунної системи здорового організму, про що свідчить відсутність змін концентрації сироваткових імуноглобулінів А, М, G, Е та вмісту ЦІК у крові тварин, а також плазматичних клітин слизової оболонки тонкої кишки з Ig А, М, G-маркерами.

2. Застосування толеративної терапії при експериментальному алергічному дерматиті супроводжується вираженим позитивним впливом на імунну систему, що підтверджується нормалізацією показників гуморальної ланки імунітету та циркулюючих імунних комплексів на етапах спостереження 21, 22 та 25 діб.

**Перспективи подальших досліджень.** Враховуючи те, що в експериментальному дослідженні отримано дані про позитивний вплив ентерального застосування кріоконсервованої ксеношкіри на стан імунної системи в динаміці експериментального алергічного дерматиту, необхідно глибше дослідити роль цитокінових механізмів у розвитку досліджуваних процесів при корекції кріоксенодермою.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бігуняк, В. В. Застосування комбінованого генетично неоднорідного субстрату в хірургічній дермопластиці / В. В. Бігуняк, В. В. Дем'яненко, Н. О. Старикова // Шпитальна хірургія. – 2007. – №2. – С. 52–56.

2. Бігуняк В. В. Можливості використання субстрату консервованої ксеногенної шкіри: проблеми і перспективи // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції / В. В. Бігуняк, В. В. Дем'яненко, Н. В. Гуда. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2007. – С. 34–36.

3. П'ятницький Ю. С. Експериментальне дослідження фармакологічних властивостей субстрату кріоконсервованої шкіри свині / Ю. С. П'ятницький, Л. В. Яковлева,

О. Ю. Кошова // Клінічна фармація. – 2013. – Т. 17, №1. – С. 56 – 63.

4. Vida Foubister and Beth Schachter, A Gut Response to Foreign Invaders/ Academy of Sciences, Apr 25, 2004. Immune Tolerance Therapy in Patients with Acquired Hemophilia Hematology, Volume 9, Number 4, August, 2004, pp. 245–257(13).

5. Ampaiwan Ch., Yingwan M., Nongnuch S., Suwat B., Atchara S., Pakawan W. The use of rituximab as an adjuvant for immune tolerance therapy in a hemophilia B boy with inhibitor and anaphylaxis to factor IX concentrate/Blood coagulation & fibrinolysis. 2008, vol. 19, n.3, p. 208–211.

6. Влияние синтетических моющих средств на реактивность кожи морских свинок / П. М. Залкан, Е. А. Иев-

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

лева // Актуальные вопросы профессиональной дерматологии. – Москва. – 1965. – С. 106–112.

7. Чернушенко Е. Ф. Иммунологические методы исследований в клинике / Е. Ф. Чернушенко, Л. С. Когосова. – К. : Здоров'я, 1978. – 159 с.

8. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. А. В. Караулова. – М. : МИА, 2002. – 651 с.

9. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.

10. Клітинний імунітет за умов різних типів адаптаційних реакцій / О.М. Радченко // Медична гідрологія та реабілітація. м 2009. – Т. 7, № 3. – С. 57–60.

11. Никулин Б. А. Оценка и коррекция иммунного статуса / Б. А. Никулин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 376 с.

## **JUSTIFICATION OF CORRECTION IMMUNE SYSTEM DISORDERS BY ENTERAL CRYOKSENODERMA APPLYING IN THE DYNAMIC OF EXPERIMENTAL ALLERGIC DERMATITIS**

**©Yu. S. Pyatnitsky, Yu. I. Bondarenko, H. S. Saturdayska**

*SHEI «Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky of MPH of Ukraine»*

**SUMMARY.** This article represents full analysis of the possibilities of correction immune system's disorders by enteral cryoksenoderma applying in modeling of experimental allergic dermatitis in various stages of observation. new data on the positive effect of enteral cryoksenoderma applying on the functioning of the immune system in experimental allergic dermatitis are found, which are based on the facts of humoral immunity normalization to the 25th day of the experiment.

**KEY WORDS:** cryoxenoderma, immunological tolerance, experimental allergic dermatitis.

Отримано 23.04.2014