

УДК 612.017.1.062:579.871.1:616-097:615.032.311.067

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ АНТИГЕННИХ ПРЕПАРАТІВ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ НА РОЗВИТОК ШКІРНОЇ РЕАКЦІЇ У КРОЛІВ

Бабич Є. М., Єлісеєва І. В., Ждамарова Л. А.,
Білозерський В. І., Бобирєва І. В.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І.
Мечникова НАМН України»

Найбільшим імунокомпетентним органом людини є кишечник, площа поверхні якого складає до 300 м². Головним його завданням як імунокомпетентного органу є забезпечення ефективного захисного бар'єру на кордоні зіткнення зовнішнього середовища з його різноманітністю антигенів, як живих (вірусів, бактерій, паразитів та ін.), так і неживих (токсинів, харчових антигенів, тощо) і внутрішнього середовища організму, яке зберігає відносну постійність. Оскільки поверхня цього зіткнення в шлунково-кишковому тракті в багато разів перевищує всі інші відкриті поверхні організму (шкіра, легені), кишечник володіє найбільш потужними системами захисту. Близько 80 % усіх імунокомпетентних клітинок організму локалізовано у слизовій оболонці кишечника. Кожний метр кишечника дорослої людини містить до 10¹⁰ лімфоцитів [1].

Морфологічно імуна система кишечника (GALT — gut associated lymphoid tissue) включає ряд структурних (солітарні лімфоїдні фолікули, Пейерові бляшки, апендикс, мезентеріальні лімфатичні вузли) і клітинних елементів, а саме: інтерепітеліальні лімфоцити, лімфоцити lamina propria, лімфоцити в фолікулах, плазматическиені клітини, макрофаги, тучні клітини, гранулоцити.

Структурні елементи GALT-системи здійснюють адаптивну імунову відповідь, сутність якої полягає у взаємодії поміж антиген-презентуючими клітинами (АПК) та Т-лімфоцитами, що контролюється клітинами імунологічної пам'яті.

Toll-подібні рецептори (Toll-like-receptors - TLR) належать до елементів природного захисту кишечного епітелію, які розпізнають «своїх» та «чужих». Вони є трансмембранними молекулами, котрі пов'язують екстра- та інтрацелюлярні структури. Ідентифіковано 11 типів TLR. В шлунково-кишковому тракті TLR-рецептори забезпечують: толерантність до індигенної мікрофлори; зниження вірогідності алергічних реакцій; доставку антигену антигенпрезентуючим клітинам (АПК); підвищення щільності міжклітинних з'єднань; індукцію антимікробних пептидів.

Слизовий бар'єр є високоселективним фільтром, який забезпечує контрольований фізіологічний транспорт часточок розмірами до 150 нм через «епітеліальні отвори». Другим механізмом надходження антигенів з просвіту кишки є транспортовка шляхом ендоцитозу через М-клітини, ко-

трі розташовуються над Пейеровими бляшками. В процесі транспортування відбувається оголення антигенних структур речовини, на базолатеральній мембрані стимулюються дендритні клітини, і в верхній частині Пейерової бляшки антиген презентується Т-лімфоцитам. Антигени, що презентуються Т-хелперам і макрофагам, розпізнаються та, у випадку наявності на поверхні клітин відповідних антигену рецепторів, Th0-клітини трансформуються в Th1 або в Th2. Трансформація в Th1 супроводжується продукцією прозапальних цитокінів: IL-1, TNF- α , IFN- γ , активізацією фагоцитозу, міграцією нейтрофілів, підсиленням окисних реакцій, синтезом IgA; всі ці реакції спрямовані на елімінацію антигену. Диференцировка в Th2 сприяє продукції протизапальних цитокінів IL-4, IL-5, IL-10, супроводжує хронічну фазу запалення з формуванням IgG, а також сприяє утворенню IgE з розвитком атопії. Через цитокіни імуна система кишечника взаємодіє із загальною імуною системою [1-3].

В-лімфоцити в процесі відповіді GALT-системи трансформуються в плазматичні клітини і виходять з кишечника в мезентеріальні лімфовузли, а звідти через грудну лімфатичну протоку – в кров. З кров'ю вони розносяться в слизові оболонки різних органів: ротової порожнини, бронхів, сечостатевої шляхів, а також у молочні залози. 80 % лімфоцитів повертається назад до кишечника; цей процес називається homing.

Отже циркуляція сенсibilізованих В- і Т-бластоцитів по гемолімфатичному колу призводить до виділення зрілого специфічного імуноглобуліну IgA, плазматичних клітин і Т-клітин в шлунково-кишкову систему.

Головною функцією GALT-системи є розпізнавання і усунення антигенів або формування імунологічної толерантності до них. Формування імунологічної толерантності є найважливішою умовою існування шлунково-кишкового тракту як бар'єру на межі зовнішнього та внутрішнього середовища. Оскільки їжа і нормальна кишкова мікрофлора є антигенами, вони не повинні сприйматися організмом як щось вороже і відторгатися їм, викликати розвиток запальної відповіді.

Імунологічна толерантність до їжі та облигатної мікрофлори забезпечується через супресію Th1 інтерлейкінами IL-4, IL-10 і стимуляцію Th3 с продукцією TGF- β при умові надходження низьких концентрацій антигену. Високі дози антигену викликають клональну анергію, при цьому Т-лімфоцити стають не здатними реагувати на стимуляцію і секретувати IL-2 або проліферувати. TGF- β є неспецифічним потужним супресорним фактором. Можливо, формування оральної толерантності до одного антигену сприяє пригніченню імунової відповіді і до інших. TGF- β сприяє переключенню синтезу імуноглобулінів з IgM на IgA. Імунологічна толерантність забезпечується також синтезом Toll-інгібууючого білку (Tollip) та пов'язаним з ним зниженням експресії TLR-2 [1-3].

За останні десятиріччя в індустриальних країнах реєструється значний ріст алергічних захворю-

вань. Існує гіпотеза, що він пов'язаний із зниженням впливу мікробних антигенів в результаті зрослої гігієни і активної вакцинації. Вірогідно, зниження стимулюючої дії бактеріальних антигенів переключає диференціювання Th-лімфоцитів з Th1 (з продукцією IL-6, IL-12, IL-18, IFN- γ та IgA) на Th2 (з продукцією IL-4, IL-10, IgG, IgE). Це може сприяти формуванню алергії.

Харчова алергія є захворюванням, яке постійно поширюється в світі, особливо у західних країнах, але ефективної форми терапії ще не знайдено. Специфічне активне лікування імуноглобулін Е (IgE)-опосередкованої харчової алергії в поточний час досліджується у клінічних випробуваннях на людях. Алерген-специфічні методи терапії включають оральну (OIT), сублінгвальну (SLIT) та нашкірну імунотерапію. Нині повідомлення про оральну імунотерапію більш поширені, ніж повідомлення про інші види імунотерапії, а саме: SLIT та нашкірний метод В світі широко застосовується оральна імунотерапія важких алергічних реакцій у дітей на харчові продукти: такі, як коров'яче молоко, білок яєць, арахіс, кеш'ю, соя, пшениця [4-9]. Оральна десенсибілізація складається з поступово збільшуваної кількості алергенного продукту, починаючи з мінімальної, для досягнення толерантності та можливості споживати даний продукт без обмежень. Перші повідомлення, присвячені даному методу були опубліковані у 1900-х роках. В подальшому опубліковані дані свідчать про те, що у більшості осіб оральна імунотерапія призводить до десенсибілізації до алергенних продуктів і дозволяє в подальшому їх споживати без шкоди для здоров'я. Проте залишається невідомим чи на довгий

час формується така толерантність [7, 8, 12]. Деякі автори попереджають про ускладнення цієї терапії – здебільшого м'які (абдомінальні болі), але в подекажних випадках шлунково-кишкові реакції потребували призначення епінефрину [7-11].

Екстраполюючи результати вказаного методу десенсибілізації на сферу імунопрофілактики, ми спробували використати головну функцію GALT-системи – розпізнавання і усунення антигенів або формування імунологічної толерантності до них – і дослідити вплив попереднього перорального застосування імунобіологічних препаратів мікробного походження на формування шкірної реакції алергічного запалення при постановці внутрішньошкірної проби з антигенними препаратами збудника дифтерії.

До експерименту були взяті різні антигенні препарати, а саме: ультразвуковий дезінтеграт мікробної маси виробничого штаму *S.diphtheriae* var. *gravis* tox+ massachusetts (ДЗ), звільнений від мікробних клітин шляхом центрифугування супернатант вказаного дезінтеграту (СН) та очищений концентрований дифтерійний анатоксин (АД). Контрольні тварини перорально одержували фізіологічний розчин.

Дослідні кролі впродовж двох днів одержували по 3,5 мл антигенного препарату (загальна пероральна доза білку – 33,6 мг), контрольні – фізіологічний розчин. Через тиждень усім тваринам було введено внутрішньошкірно по 0,2 мл відповідного антигенного препарату. Взагалі піддослідні тварини почувалися добре – були жвавими, активно споживали їжу. Результати реєстрації шкірної реакції представлені у таблиці.

Таблиця – Вплив пероральної вакцинації антигенними препаратами збудника дифтерії на формування шкірної реакції у кролів при подальшому внутрішньошкірному їх введенні

Групи кролів	Препарат, який вводили тваринам	Вид реакції	Діаметр зони реакції, мм (M \pm m)
1	СН	гіперемія, інфільтрат; некроз	-
2	К ₁	гіперемія інфільтрат некроз	6,3 \pm 1,3 8,1 \pm 1,2 1,7 \pm 0,2
3	АД	гіперемія, інфільтрат; некроз	-
4	К ₂	гіперемія інфільтрат	7 6
5	ДЗ	гіперемія, інфільтрат; некроз	6,7 \pm 0,13 2,1 \pm 0,7
6	К ₃	гіперемія, інфільтрат; некроз	14,4 \pm 1,0 2,8 \pm 1,3

Примітки: АД - дифтерійний анатоксин очищений концентрований несорбований; СН - супернатант ультразвукового дезінтеграту мікробної маси *S.diphtheriae*; ДЗ - дезінтеграт мікробної маси *S.diphtheriae*; К₁, К₂, К₃ – контроль

Після перорального введення безклітинних препаратів (СН і АД), в умовах даного експерименту, будь-якої шкірної реакції на внутрішньошкірне їх введення зареєстровано не було. В контрольних

тварин, яким було поставлено лише пробу на реактогенність, у випадку введення АД помірна реакція почервоніння та інфільтрації протрималася в тварин лише один день. При введенні СН реакції були стійки-

ми (рееструвалися впродовж 10 днів) і значнішими – до розвитку некрозу.

Щодо ультразвукового дезінтеграту мікробних клітин дифтерії (ДЗ), то він виявився реактогенним як в досліді, після перорального його введення, так і в контролі – в результаті лише тільки внутрішньошкірної ін'єкції. Але у дослідних тварин середній розмір зони гіперемії та інфільтрації досяг 6,7 мм, а зони некрозу – 2,1 мм. В той же час в контролі вказані показники склали, відповідно, 14,4 та 2,8 мм, тобто перевищували дослідні показники у 2,1 та 1,3 рази. В контрольних кролів максимум діаметру зони запалення становив 20 мм (на 7-8-й день), в дослідних – лише 9 мм (на 3-й день). Некроз розвинувся в обох тварин, причому максимум діаметру некротичних зон спостерігався в обох групах одночасно на другому тижні, але в контрольних тварин був значніший – до 6 мм (в досліді – до 3 мм).

ВИСНОВКИ

Вивчення впливу пероральної вакцинації проти дифтерії різними антигенними препаратами, а саме: ультразвуковим дезінтегратором мікробної маси виробничого штаму *C. diphtheriae var. gravis tox+ massachusetts* (ДЗ), супернатантом вказаного дезінтеграту (СН), звільненим від мікробних клітин шляхом центрифугування, та очищеним концентрованим дифтерійним анатоксином (АД) на подальше формування шкірної реакції при їх внутрішньошкірному введенні, показало результати, що свідчать про тенденцію щодо зниження ступеню проявів шкірної реакції на антигенні препарати на етапі їх парентерального введення. У випадку попередньої пероральної імунізації препаратами СН та АД реакції на внутрішньошкірне їх введення взагалі не було, а при введенні ДЗ діаметр зони гіперемії та інфільтрації був у 2,1 рази менший, ніж у контролі.

Слід відмітити підвищену реактогенність відмитих ультразвукових дезінтегратів мікробних клітин у порівнянні з вільними від мікробних клітин антигенними препаратами (АД та СН).

REFERENCES

1. Alexandrova V. A. Gastrointestinal tract immune system foundation : workbook [Text].- S.P. : MAPO, 2006.-44 p.
2. P. Rush K. Gut's an immune system management center [Text] / P. Rush K., U. Petere // Biological medicine, 2003.- № 3.- P. 4-9.
3. About antimicrobe peptyds role in human gut native immunity mechnisms [Electronic resources] / Editorial // Clinical perspective gastroenterology, gepatology, 2004. – № 3. – P. 2-10. - Access mode : <http://www.twirpx.com/file/919694/>
4. Ciprandi, G. Onset of oral allergic syndrome during birch sublingual immunotherapy. [Text] / G. Ciprandi // Eur Ann Allergy Clin Immunol. 2012 Aug;44(4):170-1.
5. Carraro, S. Impact of oral immunotherapy on quality of life in children with cow milk allergy: a pilot study. [Text] / S. Carraro, A. C. Frigo, M. Perin, S. Stefani, C.

- Cardarelli, S. Bozzetto, E. Baraldi, S. Zanconato // Int J Immunopathol Pharmacol. 2012 Jul-Sep;25(3):793-8.
6. Kulis, M. Pepsinized cashew proteins are hypoallergenic and immunogenic and provide effective immunotherapy in mice with cashew allergy [Text] / M. Kulis, I. Macqueen, Y. Li, R. Guo, X. P. Zhong, A. W. Burks // J Allergy Clin Immunol. 2012 Sep;130(3):716-23. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.044. Epub 2012 Jul 11.
7. Yu G. P. The safety of peanut oral immunotherapy in peanut-allergic subjects in a single-center trial [Text] / G. P. Yu, B. Weldon, S. Neale-May, K. C. Nadeau // Int Arch Allergy Immunol. 2012;159(2):179-82. doi: 10.1159/000336391. Epub 2012 Jun 1.
8. Crisafulli, G. Oral desensitization for immunoglobulin E-mediated milk and egg allergies [Text] / G. Crisafulli, L. Caminiti, G. B. Pajno // Isr Med Assoc J. 2012 Jan;14(1):53-6.
9. Sánchez-García, S. Efficacy of oral immunotherapy protocol for specific oral tolerance induction in children with cow's milk allergy [Text] / S, Sánchez-García, P. Rodríguez del Río, C. Escudero, C. García-Fernández, A. Ramirez, M. D. Ibáñez // Isr Med Assoc J. 2012 Jan;14(1):43-7.
10. Yeung, J. P. Oral immunotherapy for milk allergy [Electronic resource]/Yeung J. P., Kloda L. A., Mc Devitt J., Ben-Shoshan M., Alizadehfah R.// Cochrane Database Syst Rev. 2012 Nov 14;11:CD009542. doi: 10.1002/14651858.CD009542.pub2.
11. Nurmatov, U. Allergen-specific oral immunotherapy for peanut allergy [Electronic resource] /Nurmatov U, Venderbosch I, Devereux G, Simons FE, Sheikh A.// Cochrane Database Syst Rev. 2012 Sep 12;9:CD009014. doi: 10.1002/14651858.CD009014.pub2.
12. Traister, R. S. Community opinions regarding oral immunotherapy for food allergies [Text] / R. S. Traister, T. D. Green, L. Mitchell, M. Greenhawt // Annals of Allergy, Asthma & Immunology.- V.109, Issue 5. - P. 319-323.

УДК 612.017.1.062:579.871.1:616-097:615.032.311.067

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ НА РАЗВИТИЕ КОЖНОЙ РЕАКЦИИ У КРОЛЕЙ

Бабич Е. М., Елисеєва И. В., Ждамарова Л. А., Белозерский В. И., Бобирева И. В.

Изучалось влияние предварительного перорального применения антигенных препаратов возбудителя дифтерии на формирование кожной реакции аллергического воспаления при постановке с ними внутрикожной пробы. В эксперименте использовались ультразвуковой дезинтегратор микробной массы производственного штамма *C. diphtheriae var. gravis tox+ massachusetts*, освобожденный от микробных клеток путем центрифугирования супернатант указанного дезинтеграта, и очищенный концентрированный дифтерийный анатоксин. Опытные кроли получали на протяжении двух дней per os по 3,5 мл антигенного препарата (суммарная доза белка – 33,6 мг), контрольные – физиологический

раствор. Через неделю всем животным было введено внутривенно по 0,2 мл соответствующего антигенного препарата. Полученные результаты свидетельствуют о тенденции к снижению степени проявления кожной реакции на антигенные препараты при их парентеральном введении.

Ключевые слова: возбудитель дифтерии, антигенные препараты, пероральная иммунизация, кожная аллергическая реакция.

**УДК 612.017.1.062:579.871.1:616-097:615.032.311.067
ВІВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПЕРОРАЛЬНОГО
ВВЕДЕННЯ АНТИГЕННИХ ПРЕПАРАТІВ
ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ НА РОЗВИТОК ШКІРНОЇ
РЕАКЦІЇ У КРОЛІВ**

**Бабич Є. М., Єлісеєва І. В., Ждмарова Л. А.,
Білозерський В. І., Бобирєва І. В.**

Досліджувався вплив попереднього перорального застосування антигенних препаратів збудника дифтерії на формування шкірної реакції алергічного запалення при постановці внутрішньошкірної проби з тими ж препаратами. До експерименту були взяті ультразвуковий дезінтеграт мікробної маси виробничого штаму *C. diphtheriae* var. *gravis* tox+ massachusetts, звільнений від мікробних клітин шляхом центрифугування супернатант вказаного дезінтеграту та очищений концентрований дифтерійний анатоксин. Дослідні кролі впродовж двох днів одержували per os по 3,5 мл антигенного препарату (загальна доза білку – 33,6 мг), контрольні – фізіологічний розчин. Через тиждень усім тваринам було введено внутрішньошкірно по 0,2 мл відповідного антигенного

препарату. Одержані результати свідчать про тенденцію щодо зниження ступеню проявів шкірної реакції на антигенні препарати при їх парентеральному введенні.

Ключові слова: збудник дифтерії, антигенні препарати, пероральна імунізація, шкірна алергічна реакція.

**UDC 612.017.1.062:579.871.1:616-097:615.032.311.067
STUDY OF INFLUENCE OF PREVIOUS ORAL
APPLICATION OF DIPHTHERIA ANTIGENIC
PREPARATIONS ON RABBIT ALLERGIC
REACTION FORMING AFTER SKIN TEST**

**Babych Ye. M., Yelyseyeva I. V., Zhdamarova L. A.,
Belozersky V. I., Bobireva I. V.**

It's studied an influence of previous oral application of diphtheria antigenic preparations on allergic inflammation forming after skin test. It's used destroyed by ultrasonic microbe cells *C. diphtheriae* var. *gravis* tox+ massachusetts, free from destroyed cells by the use of centrifugation supernatant and refined concentrated diphtheria toxoid. Experimental rabbits are fed to 3,5 ml of one of antigenic preparations (the total protein dose is 33,6 mg), control ones are fed to saline. In a week all animals were injected intracutaneously 0,2 ml each of corresponding antigenic preparation. The findings testify to decreasing manifestation tendency of rabbit skin reactions on antigenic preparations.

Key words: diphtheria pathogen, antigenic preparations, oral immunization, skin allergic reaction.