

УДК 616–001:559.731.1–035.51]–06.616–092.9–001.5

© Ю. С. П'ЯТНИЦЬКИЙ, І. М. КЛИЩ

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського"

Дослідження ефективності подрібненого субстрату консервованої шкіри свині при експериментальному atopічному дерматиті

YU. S. PYATNYTSKYI, I. M. KLISHCH

SHEI "Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky"

RESEARCH OF THE EFFICIENCY OF MILLED SUBSTRATE OF CANNED PIG SKIN AT THE EXPERIMENTAL ATOPIC DERMATITIS

У статті наведено результати вивчення ефективності перорального застосування подрібненого субстрату ксеношкіри свині при експериментальному atopічному дерматиті, викликаному 2,4-динітрохлорбензолом. Встановлено, що ентеральне введення подрібненого субстрату ксеношкіри виявило його властивості як гіпосенсибілізатора, який сприятливо позначився на перебігу експериментального контактного дерматиту. Мембранопротекторний ефект від ентерального застосування подрібненого субстрату ксеношкіри у щурів спостерігали в тестовій пробі кислотного гемолізу і за характером лейкоцитолітичного тесту. Встановлено, що застосування шкірного подрібненого ксеносубстрату супроводжувалося помітним підвищенням резистентності еритроцитів і лейкоцитів до токсичних субстанцій в аутологічній плазмі. Зроблено висновок, що введення подрібненого субстрату консервованої шкіри свині тваринам з експериментальним atopічним дерматитом супроводжувалося покращанням стану шкірного покриву та підвищенням резистентності клітинних мембран.

The results of studying the effectiveness of milled substrate of pigs xenogenic skin oral administration at the experimental atopic dermatitis caused by 2,4-dinitrochlorobenzene were shown. It was established that enteral administration of milled substrate of xenogenic skin revealed its properties as hyposensitization which favorably affected the course of experimental contact dermatitis. Membrane-protective effect from the enteral application of milled substrate of xenogenic skin at rats was observed in the test sample of acid hemolysis and by the leucocytologic test. It was established that the use of skin milled xenosubstrate was accompanied by a noticeable increase in resistance of red blood cells and white blood cells to toxic substances in autologous plasma. It was concluded that the introduction of milled substrate of xenogenic skin of pigs to the animals with experimental atopic dermatitis was accompanied by improving the state of their skin and increase in the resistance of cell membranes.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій. Широкому застосуванню в медичній практиці органопрепаратів в останні роки сприяло як встановлення провідних патогенетичних ланок розвитку поєднаної патології органів травлення, перш за все, у вигляді дестабілізації взаємозв'язків її нейрогуморальної, імунної та вегетативної регуляції, так і зв'язку патологічних змін в системі органів травлення з порушеннями в інших функціональних системах організму. Не випадково, значного науково-практичного і медико-соціального ефекту досягнуто в результаті інноваційної реалізації сучасних технологій виготовлення органопрепаратів на основі природної тваринницької сировини.

Серед перспективних органопрепаратів слід вказати з них на ті, які спрямовані на ослаблення

або усунення патогенетично значущих ланок патогенезу, особливо тих, що стосуються формування первинного і/або вторинного імунодефіциту у вигляді імунопатологічних системних уражень сполучної тканини [9, 10, 12, 14, 19, 20, 22, 23]. 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) з використанням органопрепаратів на основі структурних білків тваринного походження є перспективним напрямком патогенетичної терапії при імунозалежній патології [11, 16, 17, 18, 21, 23].

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 не з'ясованим центральний механізм вказаного впливу. Так, вимагає уточнення питання, чи встановлені при вказаному прийомі ефекти і феномени імунотолерантності [8, 14, 16] є результатом імунного стимулу 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.

Матеріали і методи. В експерименті використали 40 статевозрілих мурчаків масою 450–500 г, які утримувались в стандартних умовах віварію [8]. Експериментальний алергійний контактний дерматит як модель реакції уповільненого типу відтворюють у мурчаків. Попередньо тварин сенсibiliзували за методикою Залкан та Івлевої [4]. Як алерген використовують 2,4-динітрохлорбензол (ДНХБ) у вигляді 5 % спиртово-ацетонового розчину. Вогнище сенсibiliзації формували на ділянці спинки тварини (9 см²), з якої попередньо видаляли хутряний покрив. ДНХБ втирали у шкіру спинки 1 раз на добу. Розрешальну дозу ДНХБ наносили на 21-й день від початку сенсibiliзації.

Про ступінь вираження дерматиту робили висновки за загальним станом і поведінкою тварин [3]. Систематично на 1-шу, 3-тю, 5-ту доби від початку серійних аплікацій алергену спостерігали за змінами шкіри. Тяжкість ураження у вигляді локальних проявів позначали умовними одиницями (балами): 0 – відсутність реакції; 0,5 – поява ізольованих почервонілих плям; 1 – дифузна помірна гіперемія; 2 – чітко окреслена гіперемія з набряканням; 3 – сильно виражена гіперемія з набряком; 4 – утворення дрібних ерозій; 5 – утворення геморагічної кірки та обширних виразок. Додатковим критерієм формування дерматиту служила товщина шкірної складки.

Специфічну фармакологічну активність дослідного подрібненого субстрату кріоліофілізованої шкіри, надалі ПСШ, досліджували за протиалергійною та протизапальною (ранозагоювальною) дією його шляхом ентерального застосування.

Досліди проводили на двох групах тварин, при двох контрольних групах:

– 1 група – інтактні мурчаки;

– 2 група – тварини з аплікованим 5-разово ДНХБ, але залишеними без лікування;

– 3 група – тварини з аплікованим 5-разово ДНХБ, яким після кожної аплікації через 2–3 год вводили ентерально 1 раз на добу упродовж 30 днів дослідний субстрат ПСШ в дозі 100 мг/кг двічі на добу;

– 4 група – тварини з аплікованим 5-разово ДНХБ, яким дослідний ПСШ в дозі 100 мг/кг почали вводити після введення розрешальної дози ДНХБ двічі на добу упродовж 9-ти діб.

Оцінку ефективності субстрату за вказаними критеріями та іншими показниками, які відображають алергію уповільненого типу в тестових пробах *in vitro* та *in vivo* [2], здійснювали на 21-шу добу від початку сенсibiliзації.

Отриманий в результаті експерименту цифровий матеріал був систематизований та оброблений за допомогою методів варіаційної статистики із використанням критерію Стьюдента [1, 6].

Результати досліджень та їх обговорення.

При проведенні даного фрагменту дослідження виходили з уявлень про те, що шкіра є природним бар'єром проникненню в організм екзогенних чинників, оскільки в шкірі зосереджена значна кількість клітин, яким притаманна участь у запальних реакціях, зокрема таких, як лімфоцити, плазматичні клітини, нейтрофіли тощо. Аналогічні клітини зосереджені також у складках (криптах) слизової оболонки кишки, які також виконують функції фагоцитозу, сприяють елімінації алергенів, беруть участь в імунно-інформативних процесах [5]. З наведених міркувань, очевидною постала необхідність експериментальної перевірки робочої гіпотези про спроможність застосування компонентів кріоконсервованої ксеногенної шкіри для здійснення неспецифічної (параспецифічної) гіпосенсибілізації при експериментальному алергійному дерматиті.

Специфічну фармакологічну активність дослідного субстрату кріоліофілізованої шкіри досліджували за рівнем протиалергійної (протизапальної) та мембранопротекторної дії в результаті її ентерального застосування. Мембранопротекторний ефект оцінювали за інтегральним індексом резистентності у тестовій реакції кислотного гемолізу, а також за характером реакції лейкоцитолізу методом люмінесцентної мікроскопії [7]. Оцінку терапевтичної ефективності субстрату за вказаними критеріями та іншими показниками, які відображають алергію уповільненого типу в тестових пробах *in vitro* та *in vivo*, здійснювали на 21-шу добу від початку сенсibiliзації.

Результати впливу ентеральної гіпосенсибілізації субстратом ксеноскіри на лабораторних тварин з

експериментальним контактним дерматитом наведені в таблиці 1.

З даних таблиці 1 видно, що вже через добу після одноразової нашкірної аплікації розчину 2,4-ДНХБ у тварин 2-ї контрольної групи мала місце помірна гіперемія (1–1,3 бала). У частини тварин спостерігали набряк як свідчення розвитку контактного дерматиту. Кожне наступне нанесення чинника супроводжувалося зростанням проявів токсичного дерматиту. Максимум їх з утворенням геморагічної кірки відмічали на 4–5-ту доби (4–5 балів). Ілюстративним виявився інший показник патологічних змін у шкірі тварини при дії 2,4-ДНХБ, зокрема зміна товщини шкірної складки.

Ентеральне введення подрібненого субстрату ксеношкіри виявило його властивості як гіпосенсибілізатора, який сприятливо позначився на перебігу експериментального контактного дерматиту. Так, на 5-ту добу спостерігали суттєве покращання стану шкірного покриву у тварин. При цьому гострота дерматиту мала суттєву тенденцію до зниження – (0,4±0,16) бала проти (4,7±0,22) в контрольній 2-й групі. На 7-му добу від початку застосування субстрату ксеношкіри кірочка відокремлювалася, а з-під неї проступав нормальний шкірний покрив. Мембранопротекторний ефект від ентерального застосування подрібненого субстрату ксеношкіри

у щурів спостерігали в тестовій пробі кислотного гемолізу з визначенням індексу мембранорезистентності. Заслугує на увагу той факт, що при введенні тваринам з контактним дерматитом ксенодермального субстрату майже відразу проявляється мембранопротекторна дія останнього, тобто не всі дні спостереження, а на 7-му, 14-ту і 21-шу доби, а саме: (24,8±2,6), (22,9±3,2) і (33,8±3,1) відповідно, проти (914,7±1,6), (8,8±2,3) та (6,9±2,2) в 2-й контрольній групі відповідно. Про мембранопротекторну дію подрібненого субстрату ксеношкіри робили висновок також і за характером лейкоцитолітичного тесту методом люмінесцентної мікроскопії. Встановлено, що спонтанний (при інкубації ізольованих клітин в аутологічній плазмі крові *in vitro*) лейкоцитоліз у тварин 2-ї контрольної групи суттєво перевищував аналогічний показник в інтактних (1-ша контрольна) тварин. Це знайшло зворотне відображення в зіставленні індексу резистентності лейкоцитів у тварин з контактним дерматитом з аналогічним в інтактних щурів: (13,4±0,8) проти (54,5±2,1) відповідно. Застосування шкірного подрібненого ксеносубстрату супроводжувалося помітним підвищенням резистентності лейкоцитів до токсичних субстанцій в аутологічній плазмі у тварин 1-ї і 2-ї дослідних груп: відповідно (33,8±3,1) і (27,4±2,5) ($p < 0,05$).

Таблиця 1. Динаміка показників контактного дерматиту у мурчаків за умов ентерального застосування подрібненого субстрату кріоліофілізованої шкіри свині

Показник	Група тварин	Вихідні дані	Дні спостереження				
			1	2	3	4	5
Ступінь шкірних проявів, бал	Контроль 1, n=10	0	0	0	0	0	0
	Контроль 2, n=8	0	1,10±0,10	2,20±0,15	3,60±0,21	4,70±0,12	4,70±0,22
	Дослід 1, n=12	0	0,90±0,09	1,60±0,21	2,10±0,22*	1,20±0,12*	0,40±0,14*
	Дослід 2, n=10	0	1,90±0,26	2,20±0,22	1,30±0,12*	1,30±0,11*	0,90±0,15*
Товщина шкірної складки, мм	Контроль 1, n=10	4,10±0,18	4,10±0,18	4,10±0,18	4,10±0,18	4,10±0,18	4,10±0,18
	Контроль 2, n=8	4,50±0,22	7,80±0,13	8,40±0,18	8,80±0,13	8,80±0,12	8,30±0,18
	Дослід 1, n=12	4,30±0,18	6,30±0,21	6,70±0,14*	5,70±0,16*	4,90±0,1*	4,60±0,15*
	Дослід 2, n=10	6,30±0,21	6,70±0,14	5,70±0,16*	4,90±0,1*	4,60±0,15*	4,60±0,15*

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно групи “нелікованих” тварин; n – кількість тварин.

Таблиця 2. Динаміка показників резистентності клітинних мембран у тварин з контактним дерматитом за умов ентерального застосування подрібненого субстрату кріоліофілізованої шкіри свині (M±m)

Показник	Група тварин	Вихідні дані	Дні спостереження		
			1	2	3
Індекс резистентності еритроцитів	Контроль 1, n=10	72,8±4,4	72,8±4,4	72,8±4,4	72,8±4,4
	Контроль 2, n=8	17,3±2,3	14,7±1,6	8,8±2,3	6,9±2,2
	Дослід 1, n=12	20,1±3,3	23,3±2,9*	29,5±3,8*	44,3±4,5*
	Дослід 2, n=10	18,4±3,8	15,0±1,7	9,4±2,4	33,8±3,2*
Індекс резистентності лейкоцитів	Контроль 1, n=10	54,5±2,1	53,7±2,5	53,8±4,1	54,9±2,3
	Контроль 2, n=8	24,9±2,5	13,4±0,8	9,3±1,8	6,7±1,1
	Дослід 1, n=12	22,0±2,6	24,8±2,6*	22,9±3,2*	33,8±3,1*
	Дослід 2, n=10	23,1±2,7	12,7±1,9	14,4±1,3	27,4±2,5*

Висновок. Введення подрібненого субстрату консервованої шкіри свині тваринам з експериментальним атопічним дерматитом супроводжувалось

покращенням стану шкірного покриву та підвищенням резистентності клітинних мембран.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алгоритмы обработки экспериментальных данных / под ред. И. А. Овсевич. – М. : Наука, 1986. – 185 с.
2. 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.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К., 2001. – 527 с.
4. Залкан П. М. Влияние синтетических моющих средств на реактивность кожи морских свинок / П. М. Залкан, Е. А. Ивлева // Актуальные вопросы профессиональной дерматологии. – М., 1965. – С. 106–112.
5. Кулага В. В. Аллергические заболевания кожи / В. В. Кулага, И. М. Романенко. – К. : Здоров'я, 1997. – 256 с.
6. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с.
7. Методи дослідження ендогенної інтоксикації організму : методичні рекомендації / М. А. Андрейчин, М. Д. Бех, В. В. Дем'яненко [та ін.]. – К., 1998. – 32 с.
8. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.
9. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral type I collagen treatment in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis: I. oral type I collagen does not improve skin in all patients, but may improve skin in late-phase disease / A. E. Postlethwaite, W. K. Wong, P. Clements [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2008. – Vol. 58, № 6. – P. 1810–1822.
10. Anti-CD4 Monoclonal Antibody-Induced Tolerance to MHC-Incompatible Cardiac Allografts Maintained by CD4+ Suppressor T Cells That Are Not Dependent upon IL-4 / B. M. Hall, L. Fava, J. Chen [et al.] // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161, № 10. – P. 5147–5156.
11. Biochemical Indexes of the Skin and Blood Melatonin Concentration in Rats during Acute Stress and Treatment with Exogenous Melatonin / S. S. Pertsov, Yu. V. Abramov, T. V. Volodina, L. B. Rebrov // *Journal Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2004. – Vol. 137, № 4. – P. 369–373.
12. Bornstein P. A Biochemical Study of Human Skin Collagen and the Relation between Intra- and Intermolecular Cross-Linking / P. Bornstein, K. A. Piez // *J. Clin. Invest.* – 1964. – Vol. 43, № 9. – P. 1813–1823.
13. Davies R. J. Antihistamines: topical is oral administration / R. J. Davies, A. C. Bagnal, R. N. McCabe // *Clin. Exp. Allergy.* – 1996. – Vol. 26, № 3. – P. 11–17.
14. EAE Tolerance Induction with Hsp70-Peptide Complexes Depends on H60 and NKG2D Activity / G. Galazka, A. Jurewicz, W. Orłowski [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179, № 7. – P. 4503–4512.
15. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of Europe. – Strasbourg, 1986. – 56 p.
16. Expansion of neonatal tolerance to self in adult life: I. The role of a bacterial adjuvant in tolerance spread / N. Grabie, I. Wohl, S. Youssef [et al.] // *Int Immunol.* – 1999. – Vol. 11, № 6. – P. 899–906.
17. Foubister V. Immune Tolerance Therapy in Patients with Acquired Hemophilia / V. Foubister, B. Schachter // *Hematology.* – 2004. – Vol. 9, № 4. – P. 245–257.
18. Horner A. A. Rat heparins. A study of the relative sizes and antithrombin-binding characteristics of heparin proteoglycans, chains and depolymerization products from rat adipose tissue, heart, lungs, peritoneal cavity and skin / A. A. Horner // *Biochem J.* – 1986. – Vol. 240, № 1. – P. 171–179.
19. Involvement of TNF-Like Weak Inducer of Apoptosis in the Pathogenesis of Collagen-Induced Arthritis / K. Kamata, S. Kamijo, A. Nakajima [et al.] // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177, № 9. – P. 6433–6439.
20. P-Selectin Can Support Both Th1 and Th2 Lymphocyte Rolling in the Intestinal Microvasculature / C. S. Bonder, M. U. Norman, T. MacRae [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2005. – Vol. 167. – P. 1647–1660.
21. Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis / N. Suzuki, A. Nakajima, S. Yoshino [et al.] // *Int. Immunol.* – 1999. – Vol. 11, № 4. – P. 553–559.
22. Slavin A. J. Mucosal administration of IL-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes / A. J. Slavin, R. Maron, H. L. Weiner // *Int. Immunol.* – 2001. – Vol. 13, № 6. – P. 825–833.
23. The use of rituximab as an adjuvant for immune tolerance therapy in a hemophilia B boy with inhibitor and anaphylaxis to factor IX concentrate / Ch. Ampaiwan, M. Yingwan, S. Nongnuch [et al.] // *Blood coagulation & fibrinolysis.* – 2008. – Vol. 19, № 3. – P. 208–211.

Отримано 28.10.14