

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 5, Number 23 (2014), 20 – 23

**DERMATOCYTOGLOBULIN'S INFLUENCE
ON ALLERGIZATION**

K. K. Muralinov, G. K. Omarbekova, O. Kozinda, Zh. K. Muralinova, A. K. Mahmutov

Kazakh national agrarian university, Almaty, Kazakhstan.

E-mails: muralinov-50@mail.ru, guljik_1979@mail.ru, kozinda.o&inbox.lv, Abazik-83@mail.ru

Key words: culture of cell, allergization, inhibition, modeling, dermatocytoglobulin.

Abstract. In the article data on application dermatocytoglobulin for inhibition of processes of an allergization are provided in cultures of an epidermis cell. It is established that dermatocellular immunoglobulin renders on 9–10 days inhibiting action in culture of of an epidermis cell on allergization processes in credits from 1:500 to 1: 520.

УДК 619:61:33-002:636.7

**ВЛИЯНИЕ ДЕРМАТОЦИТОГЛОБУЛИНА
НА АЛЛЕРГИЗАЦИЮ**

К. К. Муралинов, Г. К. Омарбекова, О. Козинда, Ж. К. Муралинова, А. К. Махмутов

Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: культура клеток, аллергизация, ингибирование, моделирование дерматоцитоглобулин.

Аннотация. В статье приводятся данные по изучению дерматоцитоглобулина для ингибирования процессов аллергизации в культурах клетки эпидермиса. Установлено, что дерматоцеллюлярный иммуноглобулин оказывает на 9–10 сутки ингибирующее действие в культуре клеток эпидермиса на процессы аллергизации в титрах от 1:500 до 1: 520.

Введение. Проблема лечения аллергического дерматита (АД) животных является актуальной для современной ветеринарной науки и практики. Аллергический дерматит является дерматозом, в механизмах развития которого ведущее значение придается иммунным нарушениям. Иммунопатогенез данного заболевания достаточно сложен. Он парадоксально сочетает в себе угнетение клеточного иммунитета и активацию клеточно-опосредованной аллергической реактивности. По существующим представлениям важнейшим звеном иммунной дисфункции при АД следует считать Т-клеточный иммунитет [1–3].

Кожа является высокоорганизованным органом, ассоциированным с иммунной системой, и обладает необходимым составом иммунокомпетентных клеток, взаимодействующих с помощью поверхностных рецепторных структур и цитокинов. Иммунокомпетентные клетки кожи осуществляют свои функции не как фиксированная ткань, а как рециркулирующие клетки. В коже присутствуют все типы иммунокомпетентных клеток, способных реализовать все типы иммунологических реакций, что в значительной мере определяет формирование иммунокомпетентности кожи в нормальных условиях [4, 5].

Нарушения иммунологической реактивности при АД в определенной степени зависят от сопутствующей патологии и осложнений. Эффективность терапии АД возможно при коррекции иммунопатогенеза подавлением синтеза аллерген-реактивных клеток, и восстановлением нарушенного клеточного иммунитета [6–8].

Имеющиеся в настоящее время методы лечения аллергизации являются паллиативными и не оказывают патогенетического действия. Целью исследования была разработка нового способа лечения и превентизации аллергического дерматита. С этой целью было изучено ингибирующее действия дерматоцитоглобулина в культуре эпителиальных клеток на процессы аллергизации.

Материал и методы

Работа проводилась на кафедре «Акушерства, хирургии и биотехнологии размножения» и в Казахстанско-Японском инновационном центре. С этой целью исследовали цитопатическое действие дерматоцеллюлярной сыворотки от кролика и выделенных из нее иммуноглобулинов на культурах клеток эпидермальных клеток, (культивированный многослойный эпидермис коровы) в различных разведениях (от 1:10 до 1:640). Неспецифические ингибиторы устраняли путем нагревания дерматоцеллюлярной сыворотки и ее иммуноглобулинов в водяной бане при +61°C в течение 30 минут. Для контроля использовали нормальную сыворотку кролика и ее иммуноглобулины.

Для получения культуры клеток кожи у доноров – коров срезали лоскуты кожи толщиной 0,2–0,3 мм. Кусочки кожи помещали в транспортную среду (199, DMEM или другую) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков (гентамицина) и доставляли в лабораторию. В боксе пробы кожи 2–3 раза промывали в растворе Хенкса, разрезали на тонкие полоски шириной 0,1–0,3 мм и помещали в 0,25% раствор трипсина на 16–20 ч при температуре + 4°C. После этого дважды промывали в растворе Хенкса и отделяли дерму от эпидермиса.

Кусочки ткани эпидермиса измельчали на отдельные фрагменты, обрабатывали 0,25 % раствором трипсина (Sigma, США) в течение 30 мин при +37°C. По истечении указанного времени флаконы извлекали из термостата, ферменты нейтрализовали добавлением 10 % эмбриональной сыворотки. Полученные суспензии клеток пропускали через стерильные фильтры с диаметром пор 200 мкм, затем клетки осаждали центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 минут. Осадки ресуспендировали в питательной среде DMEM с 10% сыворотки и гентамицином – 50 мкг/мл. Количественный выход жизнеспособных клеток определяли при их окраске 0,5% раствором трипанового синего и подсчете в камере Горяева. Посевная доза клеток составляла 500 тысяч в 1 мл ростовой среды.

Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C. Смену среды осуществляли через каждые 3 дня. Наблюдение за ростом клеток проводили в течение 10–12 дней с использованием светового микроскопа. В работе применяли Дульбекко модифицированную питательную среду Игла с низким содержанием Ca²⁺ (0,05мМ), (Sigma, США). В качестве добавок к питательной среде использовали: KGF, 20 нг/мл (Stem Cell Technologies, Канада), эмбриональная сыворотка, 10% (Sigma, США). Для культивирования эпителиальных клеток использовали пластиковые (полистирол) флаконы, с площадью ростовой поверхности 25 см², обработанные коллагеном типа 1А и обладающие высокой адгезивной способностью, предназначенные для культивирования эпителиальных клеток (фирма Costar, США).

В культуры клеток эпидермиса вводили полученную нами дерматоцеллюлярную сыворотку и выделенный из нее иммуноглобулины в испытуемых разведениях и вели наблюдение в течение 10 суток.

Результаты исследования и их обсуждение

Опыты проведенные на культуре клеток эпидермальных клеток показали, что дерматоцитоглобулин оказывает цитотоксическое действие на культуру эпидермальных кератиноцитов в первые двое суток в разведении до 1:10, затем на 5 сутки – в разведении до 1:20 и на 7–10 сутки цитотоксический эффект наблюдался в разведении до 1:40. Контрольные исследования с нормальным иммуноглобулином показали слабо выраженное цитотоксическое действие в разведениях от 1:10 до 1:20.

После установления предельных титров полученного биопрепарата по ЦПД₅₀ нами изучалось его ингибирующее действие на процессы аллергизации в культурах клеток эпидермиса. Рабочие разведения испытуемых биопрепаратов начинались с предельного титра, не дающего реакцию на

ЦПД₅₀ на культурах клеток. Для определения ингибирующего действия разработанного нами биопрепарата использовали вытяжку из кожи пораженного аллергическими процессами (антиген) взятого от кролика моделированного аллергическим дерматитом (200 ЦПД₅₀). В культуры клеток эпидермиса вводили дерматоцитоглобулин, а затем антиген.

Антицеллюлярный иммуноглобулин вызывал подавление процессов аллергизации в культуре клеток начиная с 3 суток в разведении до 1:380, на 5 сутки роста не отмечалось в разведении до 1:420 и на 8–10 сутки оказываемый ингибирующий эффект был до разведения 1:520 (таблица).

Определение ингибирующего воздействия дерматоцитоглобулина на аллергизацию в культуре клеток по ЦПД₅₀

Сроки просмотра клеток (сутки)	Разведение иммуноглобулина						Окончательный результат
	1:320	1:380	1:420	1:480	1:520	1:580	
2	++	+	–	–	–	–	–
3	++	++	–	–	–	–	1:220
4	+++	++	+	–	–	–	1:220
5	+++	++	++		–	–	1:260
6	+++	+++	++	+	–	–	1:260
7	+++	+++	++	+		–	1:320
8	+++	+++	++	++	+	–	1:320
9	+++	+++	++	++	+	–	1:320
10	+++	+++	+++	+++	++	–	1:320

Нормальная контрольная сыворотка ингибирующее действие на процессы аллергизации не оказывала.

Культуры клеток без испытуемых препаратов в которую вносили аллерген на 5–7 сутки полностью аберрировали и прекратили рост. Специфический антицеллюлярный иммуноглобулин обладает способностью подавлять процессы аллергизации при непосредственном воздействии на клетку. Ингибирующее действие антицеллюлярного иммуноглобулина на репродукцию культуры клеток подверженных процессам аллергизации свидетельствует об общебиологическом характере этого феномена.

В настоящее время патогенетическое лечение аллергизации становится проблематичным. Применение гормонов или седативных препаратов оказывает паллиативный эффект. Методы десенсибилизации затруднительны установлением аллергена. Проведенными исследованиями была установлена возможность применения дерматоцитоглобулина для проведения направленного лечения аллергического дерматита.

Установлено, что дерматоцитоглобулин обуславливает ингибирование аллергизации в культурах клеток эпителия на 10 сутки в разведении от 1:480 до 1:520. Следовательно, дерматоцеллюлярный иммуноглобулин обладает способностью ингибировать процессы аллергизации.

Механизм действия этого препарата заключается в блокировании структур клеточных рецепторов, препятствующих развитию внутри клеток процессов аллергизации. Дерматоцитоглобулин не является в иммунном отношении специфичным к антигену, вызывающему аллергию, не вступает с ним в иммунные реакции, следовательно, не происходит образование иммунных комплексов и развитие в последующем иммунопатологических расстройств.

Выводы. Дерматоцитоглобулин обладает ингибирующим воздействием на процессы аллергизации в культуре клеток эпидермиса, следовательно, может осуществлять санацию организма больных животных от аллергизации. Применение этого препарата позволит направленно регулировать эффективность лечения больных аллергическим дерматитом животных.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Howell M., Eui Kim B., Gao P., Audrey V. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression // J Allergy Clin. Immunol. – 2007. – N 7. – P. 150-155.

- [2] Belsito D.V. Patch testing with a standard allergen («screening») tray: rewards and risks // *Dermatol Ther.* – 2004. – Vol. 17, N 3. – P. 231-239.
- [3] Peter H.S., Michelson H., Ralph J. Keratinocyte growth factor stimulates bronchial epithelial cell proliferation in vitro and in vivo // *Am.&Physiol Lang Cell Mol.* – 2007. – Vol. 277. – P. 737-742.
- [4] Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Под ред. проф. Л. П. Дьяконова, проф. В. И. Ситкова. – М.: Компания Спутник+, 2000. – С. 211-225.
- [5] Терских В.В., Васильев А.В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных. Проблемы культивирования и трансплантации. – М.: Наука, 1995. – С. 36-45.
- [6] Boyce S.T. Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media // *J. Tissue Cult. Meth.* – 1985. – Vol. 9, N 2. – P. 83-93.
- [7] Chen L. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model / L. Chen, O. Martinez, L. Overbergh et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2004. – Vol. 138, N 3. – P. 375-387.
- [8] Robinson C.B., Wu R. Culture of Conducting Airway Epithelial Cells in Serum-Free Medium // *J.Tiss. Cult. Meth.* – 1991. – Vol. 13. – P. 95-102.

REFERENCES

- [1] Howell M., Eui Kim B., Gao P., Audrey V. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin. Immunol.* 2007. N 7. P. 150-155.
- [2] Belsito D.V. Patch testing with a standard allergen («screening») tray: rewards and risks. *Dermatol Ther.* 2004. Vol. 17, N 3. P. 231-239.
- [3] Peter H.S., Michelson H., Ralph J. Keratinocyte growth factor stimulates bronchial epithelial cell proliferation in vitro and in vivo. *Am.&Physiol Lang Cell Mol.* 2007. Vol. 277. P. 737-742.
- [4] Animal cage in culture (Methods and application in biotechnology). Under the editorship of the prof. L. P. Dyakonov, the prof. V. I. Sitkov. M.: Satellite company +, 2000. With 211-225.
- [5] Terskikh V.V., Vasilyev A.V. Epidermalnye keratinoциты person and animals. Cultivation and transplantation problems. M.: Science, 1995. P. 36-45.
- [6] Boyce S.T. Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media. *J. Tissue Cult. Meth.* 1985. Vol. 9, N 2. P. 83-93.
- [7] Chen L. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model. L. Chen, O. Martinez, L. Overbergh et al. *Clin. Exp. Immunol.* 2004. Vol. 138, N 3. P. 375-387.
- [8] Robinson C.B., Wu R. Culture of Conducting Airway Epithelial Cells in Serum-Free Medium. *J. Tiss. Cult. Meth.* 1991. Vol. 13. P. 95-102.

АЛЛЕРГИЗАЦИЯҒА ДЕРМАТОЦИТОГЛОБУЛИННИҢ ӘСЕРІ

К. К. Муралинов, О. Г. К. Марбекова, О. Козинда, Ж. К. Муралинова, А. К. Махмутов

Қазақ ұлттық аграрлық университеті» РМҚ, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: жасушалардың өсінділері, аллергияциялау, тежеу, модельдеу, дерматоцитоглобулин.

Аннотация. Мақалада эпидермис торшалары культураларындағы аллергияция үрдісін ингибирлеу үшін дерматоцитоглобулинді қолдану туралы мәліметтер келтірілген. Дерматоцеллюлярлық иммуноглобулиннің эпидермис торшалары культураларында 9-10 тәулікте, 1:500-ден 1:520-ға дейінгі аралықтағы титрлерде аллергияция үрдісіне ингибирлеуші әсер ететіні анықталды.

Поступила 15.09.2014