

УДК615.218.3

АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ МОНОМЕРНЫМ АЛЛЕРГОИДОМ ИЗ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ *DERMATOPHAGOIDES* *PTERONYSSINUS* НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА

А.А. Ласкин, А.А. Бабахин, О.Ю. Камышников, И.С. Гуцин, М.Р. Хаитов
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, г. Москва

Ключевые слова: аллергенный экстракт, мономерный аллергоид, экспериментальная аллерген-специфическая иммунотерапия, экспериментальная модель аллергического ринита

Цель работы. Изучение эффективности экспериментальной аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) мономерным аллергоидом (sD1), полученным путем сукцинирования аллергенного экстракта из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (D1), на экспериментальной (мышьиной) модели аллергического ринита (ЭМАР). **Материалы и методы.** Мышей линии BALB/c иммунизировали немодифицированным экстрактом (D1) из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) в смеси с гидроокисью алюминия [Al(OH)₃] трижды с интервалом в три недели, после чего через 6 нед подвергали челленджированию (разрешающему воздействию) путем интраназального введения аллергенного экстракта D1. Экспериментальную АСИТ проводили в интервале между последней иммунизацией и началом челленджирования. Первая группа животных получила «ложную АСИТ» в виде 16 подкожных (п/к) инъекций фосфатно-солевого буферного раствора (PBS); вторая — 16 п/к инъекций немодифицированного D1 в возрастающих дозах (белкового эквивалента): 1; 10; 100 и 1000 мкг/мышь; третья — 8 п/к инъекций sD1 в возрастающих дозах (белкового эквивалента): 100; 550 и 1000 мкг/мышь; четвертая — комбинированную АСИТ: 4 п/к инъекций sD1 в дозах 100; 550; 1000 мкг/мышь и 4 сублингвальных (с/л) введения sD1 в дозе 1000 мкг/мышь. Пятая группа служила отрицательным контролем: иммунизация, экспериментальная АСИТ и челленджирование осуществлялись введениями PBS. Сразу после последнего челленджирования оценивали клиническую симптоматику экспериментального ринита (по количеству чиханий в минуту), а через 24 ч после окончания челленджирования проводили оценку частоты дыхания при помощи использования неинвазивной плетизмографии. Через 48 ч после последнего челленджирования животных всех групп умерщвляли и проводили забор материала для гистологического исследования (голова целиком) с целью оценки гистологической картины выраженности аллергического ринита в носовой полости. Забор крови для получения сывороток у животных производили трижды: через 7 дней после последней иммунизации, за 1 день до челленджирования и через 24 ч после последнего челленджирования. Уровни анти-Der p IgE, IgG1, IgG2a в индивидуальных сыворотках определяли твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА). **Результаты и обсуждение.** Показано, что все три варианта АСИТ (группы 2, 3, 4) существенно снижали число актов чихания, причем наибольшее снижение происходило в 3-й группе, получавшей АСИТ мономерным аллергоидом sD1. Количество дыхательных актов в минуту у животных 2- и 4-й групп, получавших АСИТ соответственно немодифицированным D1 и sD1 (комбинированное п/к и с/л введение), было достоверно выше такового в 1-й группе (модель ЭМАР). Уровни анти-Der p IgE в 1–4-й группах после 3-й иммунизации возрастал по сравнению с 5-й группой (отрицательный контроль). После завершения АСИТ уровни анти-Der p IgE во 2-, 3- и 4-й группах повышались как относительно 5-й группы (отрицательный контроль), так и относительно 1-й группы (положительный контроль — модель ЭМАР). Однако после проведения челленджирования наивысшие уровни анти-Der p IgE отмечались в 1- и 4-й группах, в то время как в 3-й группе отмечалась тенденция к снижению, а во 2-й группе уровень анти-Der p IgE был существенно ниже такового в 1-й группе (контроль ЭМАР). Анти-Der p IgG1 достоверно повышался во 2-, 3-, 4-й группах (получавших АСИТ), причем это повышение сохранялось и после челленджирования. Анти-Der p IgG2a демонстрировал тенденцию к увеличению после АСИТ в 3-, 4-й группах, причем после челленджирования уровень анти-Der p IgG2a в 4-й группе был достоверно выше такового 1-й группы. При гистологической оценке общая картина воспаления, слизистая экссудация, гиперплазия слизистой оболочки были существенно более выражены в 1- и 2-й группах по сравнению с 5-й группой (отрицательный контроль). В то же время во 2-й группе наблюдалась тенденция к снижению вышеуказанных показателей, а в 3- и 4-й группах (АСИТ sD1 и комбинированная п/к и с/л АСИТ sD1) наблюдалось полное подавление этих показателей. **Заключение.** По совокупности полученных данных можно сделать вывод о том, что АСИТ мономерным аллергоидом из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus*, полученным методом сукцинирования, может быть новым эффективным и безопасным подходом в терапии аллергического ринита, включая проведение комбинированного курса инъекционной и сублингвальной АСИТ, что может повысить эффект лечения и в конечном счете — качество жизни пациентов.

Адрес для корреспонденции

Александр Александрович Бабахин
E-mail: alexbabahin@list.ru

Аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) является этиологически обоснованным, влияющим на все звенья аллергического процесса патогенетическим видом лечения аллергических

болезней, которые достигли уровня пандемии в индустриально развитых странах, где заболеваемость населения составляет 20–30% [1–3]. Использование АСИТ, примененной впервые в 1911 г. [4, 5], продолжает сталкиваться с проблемами безопасности и эффективности. Традиционная (инъекционная) АСИТ, основанная на использовании нативных аллергенных экстрактов, сопряжена с риском появления местных и системных реакций, причем последние часто носят угрожающий жизни характер, что может привести к фатальным последствиям [6, 7]. Поэтому пути усовершенствования АСИТ связаны с повышением ее безопасности и эффективности и направлены на разработку как новых подходов в создании гипоаллергенных препаратов, так и на внедрение в клиническую практику альтернативных путей введения аллергенных экстрактов (таких как сублингвальный, интраназальный, пероральный, накожный и др., а также включая комбинацию инъекционного и сублингвального путей введения).

В предыдущих исследованиях показана возможность химической модификации аллергенов методом сукцинирования для получения мономерных алергоидов с пониженной аллергенностью и сохраненной иммуногенностью, что в случае АСИТ этими алергоидами приводит к переключению иммунного ответа организма на аллерген с Th2-зависимого на Th1-зависимый [8].

Одной из распространенных форм круглогодичной аллергии является аллергия к клещам домашней пыли, которой страдают во всем мире примерно 10–20% населения [9]. Причем причинно-значимая роль клещей *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae* в появлении симптомов atopических аллергических заболеваний хорошо установлена [10]. Несколько контролируемых клинических исследований по изучению эффективности инъекционной и сублингвальной АСИТ при аллергии к клещам домашней пыли показали противоречивые результаты [11]. Поэтому создание новых гипоаллергенных препаратов для лечения аллергии к клещам домашней пыли, основанных на новых подходах, крайне востребовано. В предыдущем исследовании нами получен гипоаллергенный мономерный алергоид из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*, обладающий пониженной аллергенностью (способностью связывать аллерген-специфический IgE) и сохраненной (даже увеличенной) иммуногенностью (способностью индуцировать аллерген-специфический IgG1 и IgG2a) [12].

Целью данного исследования было изучение эффективности экспериментальной АСИТ мономерным алергоидом, полученным из аллергенного экстракта клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*), на мышинной модели аллергического ринита (АР).

Материалы и методы

Жидкий экстракт клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (D1), полученный из ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова и произведенный согласно действующему лабораторному регламенту на основании патента RU 2331437 С1 (А61К39/35), после грубой и стерилизующей фильтрации был лиофилизирован, после чего часть высушенного экстракта D1 была модифицирована сукцинированием (sD1), как описано ранее [12]. Модифицированный sD1 представлял собой мономерный алергоид, хорошо растворимый в воде и физиологическом растворе.

Данные по экспериментальной АСИТ на модели экспериментального аллергического ринита с использованием мономерного алергоида sD1 получены с использованием самок мышей линии BALB/c, поставленных из питомника ГУНЦБМТ «Столбовая». Возраст мышей на момент начала эксперимента составлял 8 нед, а их масса тела колебалась в пределах 19–21 г. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с приказом МЗСР РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» и «Положением об этическом отношении к лабораторным животным ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

В течение эксперимента мыши находились в клетках для содержания лабораторных животных «клетки-стандарт Т-3» производства ООО «НПК Открытая наука» (Россия) на территории вивария ВОИЦ им. Н.Н. Блохина. Температура воздуха в виварии – 23 °С, относительная влажность – 40–60%, световой режим – (12:12 ч). Животным был обеспечен неограниченный доступ к воде (ГОСТ 2874–82 Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством) и полнорационному экструдированному комбикорму, рецепт ПК-120 для содержания лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков), сертификат соответствия № РОСС RU. ПР 98. В 01272, ГОСТ Р 51849–2001 Р.5 производства ООО «Лабораторкорм» (Россия). На этапе сенсibilизации производилось систематическое наблюдение за состоянием животных (еженедельный визуальный осмотр), на этапах проведения экспериментальной АСИТ и челленджирования проводился ежедневный осмотр.

Мыши были распределены на 5 групп (n=8 в группе) (рис. 1). 1–4-я группы иммунизировали внутривенно (в/в) в объеме 0,5 мл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) смесью 50 мкг/мышь (по белку) D1 и 2 мг Al(OH)₃ трижды с интервалом 3 нед. 5-ю группу (отрицательный контроль) ложно иммунизировали 0,5 мл PBS. Экспериментальная АСИТ начиналась через десять дней после последней иммунизации, когда мышам вводили подкожно (п/к) D1 или sD1 в объеме 150 мкл PBS. Схемы АСИТ

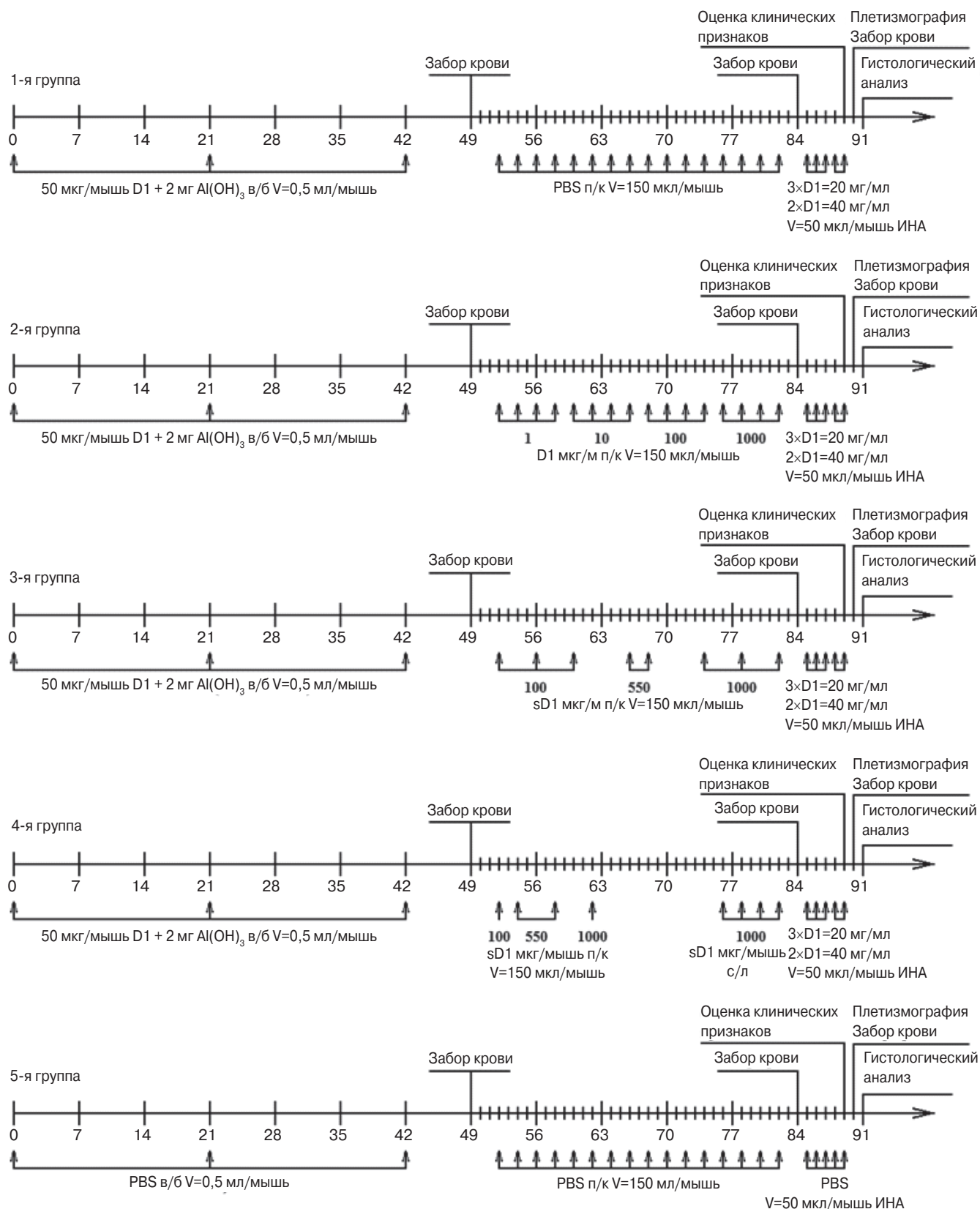


Рис. 1. Схема экспериментальной АСИТ на мышинной модели АР

для 1–5-й групп состояли в следующем (см. рис. 1): 1-я и 5-я группы получали ложную АСИТ PBS 16 раз через день; 2-я группа получала по 4 инъекции в возрастающих дозах D1 (1; 10; 100; 1000 мкг/мышь), всего 16 инъекций; 3-я группа получала инъекции sD1 в возрастающих дозах (три раза 100 мкг/мышь, два раза 550 мкг/мышь и три раза 1000 мкг/мышь), всего 8 инъекций с интервалом в три дня между инъекциями одной концентрации и с интервалом в пять дней перед повышением количества вводимого аллергоида; 4-я группа получала инъекции возрастающими дозами sD1 (один раз 100 мкг/мышь, два раза 550 мкг/мышь и один раз 1000 мкг/мышь) с трехдневным интервалом между инъекциями. Через 12 дней после последней инъекции животным 4-й группы начинали сублингвальное (с/л) введение sD1 по 1000 мкг/мышь в объеме 50 мкл PBS через день, всего 4 раза.

Через 3 дня после окончания экспериментальной АСИТ мышей 1–4-й групп челленджировали интраназальными аппликациями (ИНА) по 50 мкл/мышь D1 в концентрации 20 мг/мл (по белку) три дня подряд, после чего еще два дня подряд в концентрации 40 мг/мл (по белку). 5-я группа получала ИНА PBS.

Сразу после последнего челленджирования мышей проводили оценку проявлений клинических симптомов ринита (в частности чихания). Для этого после ИНА каждую мышь помещали в отдельную клетку, где в течение пяти минут производили подсчет актов чихания (учитывалось наличие характерного звука и движения головой). Для подсчета использовали «слепой метод» во избежание неосознанного искажения экспериментатором результатов.

Через 24 ч после последнего челленджирования оценивали частоту дыхания при помощи использования плетизмографа – двухкамерного прибора FinePointe NAM (Vuxco, США). После настройки прибора и калибровки мышей разных групп помещали в специальные пластиковые камеры плетизмографа, состоящие из назальной и торакальной частей, после чего фиксировали. В небулайзер назальной части камеры вносили по 10 мкл раствора метахолина (Mx) в концентрациях 6,25; 12,5 и 25 мг/мл. В течение 3 мин работы прибора для каждой концентрации Mx с использованием программного обеспечения рассчитывали показатель f (частота дыхания), который анализировали по каждой точке (концентрации Mx) для каждой группы. Критерием эффективности модели AP (1-я группа) было снижение показателя частоты дыхания мышей относительно группы отрицательного контроля (5-я группа), имеющих максимальные значения f, свидетельствующие о свободном (нормальном) воздушном потоке через носовую полость.

Забор крови у животных из ретроорбитального пространства для получения сывороток произво-

дили три раза: через 7 дней после последней иммунизации, за 1 день до челленджирования и через 24 ч после последнего челленджирования. Уровни анти-*Der p* IgE, IgG1, IgG2a в индивидуальных сыворотках определяли твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА), как описано ранее [13].

Через 48 ч после последнего челленджирования животных всех групп умерщвляли и проводили забор материала для гистологического исследования (голова целиком) с целью оценки гистологической картины выраженности аллергического ринита (АР) в носовой полости. Кратко: головы мышей после декапитации фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина. После этого проводили процедуру декальцинации костной ткани головы: голову целиком переносили в реагент для быстрой декальцинации костной ткани (J.T.BAKER, Decalcifier, Нидерланды) в соотношении объем ткани: объем реагента 1:20 на 6–8 ч при температуре 37 °С. Данный метод является модификацией метода декальцинации в соляной кислоте, описанного ранее [14].

Затем препаровальной иглой определяли качество декальцинации по мягкости плоских костей черепа путем прокола в нескольких местах. При полном размягчении костей черепа скальпелем проводили фронтальный разрез лицевого отдела черепа в области лунок верхних резцов и вырезали образцы ткани во фронтальной плоскости толщиной 3–5 мм, которые проводили, используя метод обработки в спирт-хлороформе, заливали в парафин, готовили гистологические срезы толщиной 3–5 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином. При этом срезы готовили в направлении на голове: ростральном – к носу и каудальном – по направлению к затылку. Микроскопирование препаратов осуществляли при увеличении $\times 400$.

Для полуколичественной оценки гистологических изменений использовали модифицированную шкалу (в баллах), основанную на данных Ennis и соавт. [15]:

1) Общая картина воспаления носовой полости: 0 баллов – отсутствует; 1 балл – слабо выраженная картина воспаления; 2 балла – умеренно выраженная картина воспаления; 3 балла – сильно выраженная картина воспаления.

2) Слизистая экссудация в носовой полости: 0 баллов – отсутствует; 1 балл – слабо выраженная (без клеток воспаления); 2 балла – умеренно выраженная (с наличием в составе экссудата умеренного количества клеток воспаления – полинуклеарных лейкоцитов); 3 балла – сильно выраженная (наличие в составе экссудата большого количества клеток воспаления – полинуклеарных лейкоцитов и макрофагов).

3) Гиперплазия слизистой оболочки носовой полости: 0 баллов – отсутствует; 1 балл – умерен-

ное увеличение количества бокаловидных клеток и умеренное увеличение высоты эпителиального слоя; 2 балла – выраженное увеличение количества бокаловидных клеток и выраженное увеличение высоты эпителиального слоя.

Результаты и обсуждение

До начала АСИТ состояние животных во всех группах было одинаковым, то есть не отмечались какие-либо патологические проявления. Однако во 2-й группе после второго введения 1000 мкг/мышь D1 (78-й день эксперимента) отмечены местные реакции: выпадение шерсти в области инъекций и наличие уплотнения. На 80-й день у 50% мышей отмечены элементы изъязвления в области инъекции, причем этот показатель повышался до 75% на 82-й день. У животных остальных групп подобных проявлений отмечено не было. В то же время во время проведения челленджирования у мышей модельной группы (1-я группа) наблюдались слабо выраженные системные анафилактические реакции (боковое положение, характерное взъерошивание шерсти, отек мордочки).

После последнего челленджирования отмечено, что при всех трех вариантах АСИТ во 2–4-й группах существенно снижалось проявление клинических признаков (по результатам подсчета актов чихания) (рис. 2 а). Причем наибольшее снижение количества актов чихания отмечено у животных 3-й группы, получавших мономерный аллергоид sD1. При инструментальной оценке клинических проявлений экспериментального ринита методом неинвазивной плетизмографии было выяснено, что в группах у животных, подвергавшихся ИНА экстрактом D1, заметно снижалась частота дыхания (рис. 2 б). Стоит отметить тот факт, что, несмотря на отсутствие улучшений по данному показателю в 3-й группе (АСИТ sD1), количество дыхательных актов в минуту у животных 2-й и 4-й групп (АСИТ соответственно D1 и sD1 – комбинированное п/к и с/л введение) было достоверно выше такового в 1-й группе (модель АР).

При оценке анти-*Der p* IgE было выявлено, что после третьей иммунизации уровень аллерген-специфического IgE возрастал в 1–4-й группах (рис. 3). После завершения АСИТ уровни анти-*Der p* IgE во 2-й, 3-й и 4-й группах повышались как относительно 5-й группы (отрицательный контроль), так и относительно 1-й группы (положительный контроль – модель АР). Однако после проведения челленджирования наивысшие уровни анти-*Der p* IgE отмечались в 1-й и 4-й группах, в то время как в 3-й группе отмечалась тенденция к снижению, а во 2-й группе уровень анти-*Der p* IgE был существенно понижен в сравнении с 1-й группой. Относительно уровней анти-*Der p* IgG1 можно отметить устойчивое, статистически достоверное повышение во 2-й,

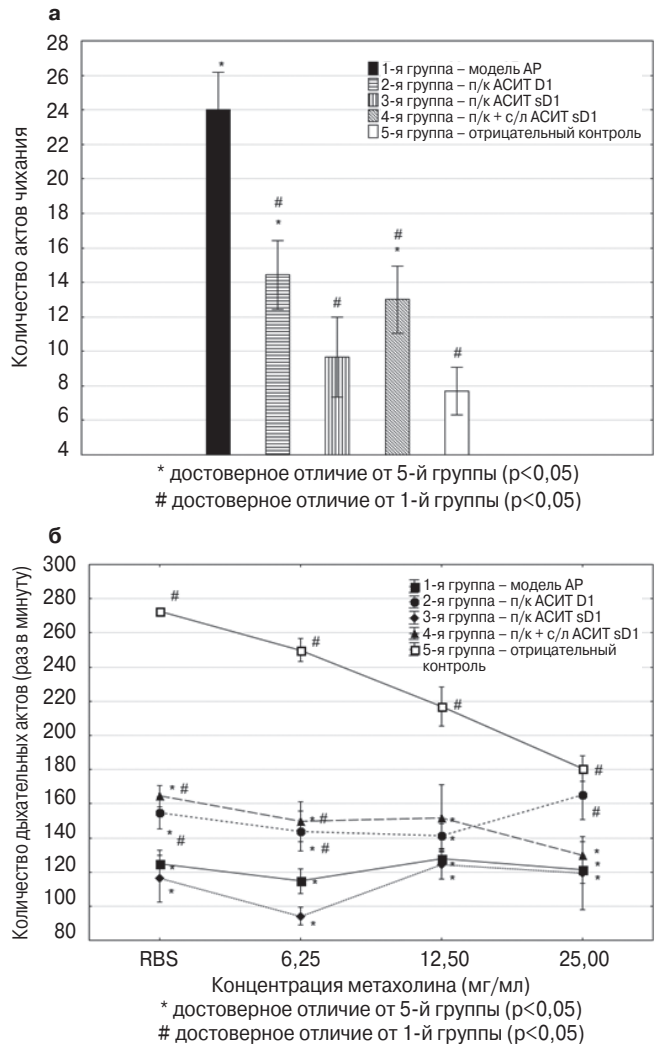


Рис. 2. Оценка клинических проявлений у мышей BALB/c с АР, получавших АСИТ D1 или sD1: а – количество актов чихания у мышей после челленджирования; б – частота дыхания мышей после челленджирования

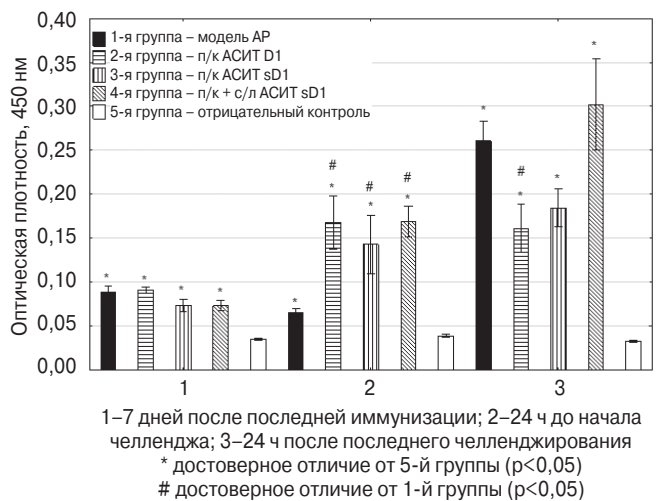


Рис. 3. Уровни анти-*Der p* IgE ($M \pm m$) в индивидуальных сыворотках мышей BALB/c с АР, получавших экспериментальную АСИТ D1 или sD1 (разведение сывороток 1:10)

3-й и 4-й группах, получавших АСИТ, которое сохранялось и после челленджирования (рис. 4). Уровни анти-*Der p* IgG2a демонстрировали тенденцию к увеличению после АСИТ, которая была наиболее выражена в 3-й и 4-й группах, причем после челленджирования уровень анти-*Der p* IgG2a в 4-й группе был достоверно выше такового 1-й группы (рис. 5).

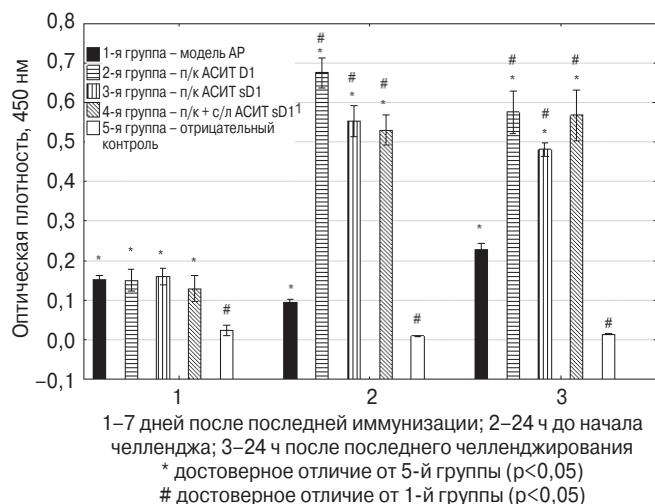


Рис. 4. Уровни анти-*Der p* IgG1 ($M \pm m$) в индивидуальных сыворотках мышей BALB/c с АР, получавших экспериментальную АСИТ D1 или sD1 (разведение сывороток 1:5000)

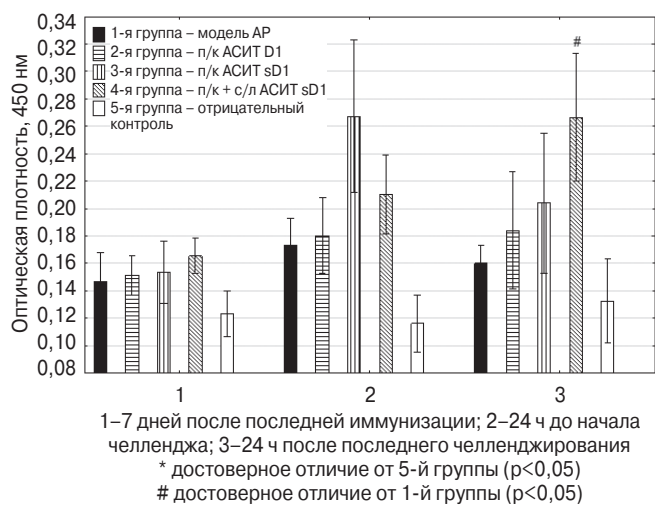


Рис. 5. Уровни анти-*Der p* IgG2a ($M \pm m$) в индивидуальных сыворотках мышей BALB/c с АР, получавших экспериментальную АСИТ D1 или sD1 (разведение сывороток 1:400)

При гистологической оценке общая картина воспаления, слизистая экссудация, гиперплазия слизистой оболочки были существенно более выражены в 1-й и 2-й группах по сравнению с группой отрицательного контроля (5-я группа). В то же время во 2-й группе наблюдалась тенденция к снижению вышеназванных показателей. Вместе с тем в 3-й и 4-й группах (АСИТ sD1 и комбинированная п/к и с/л АСИТ sD1) наблюдалось полное подавление этих показателей (рис. 6).

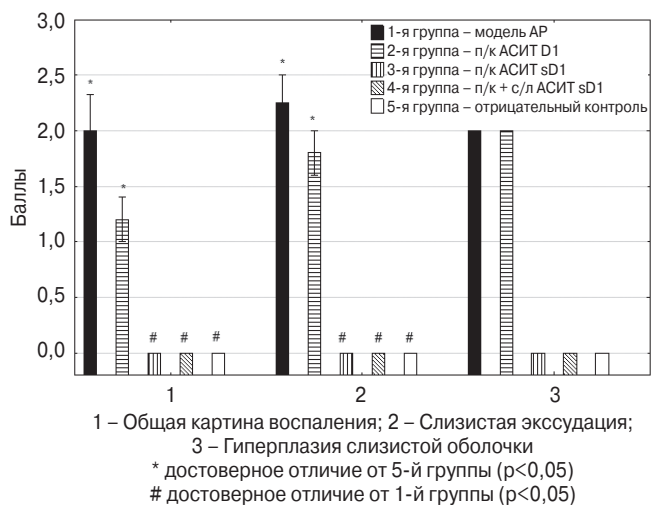


Рис. 6. Гистологические изменения в носовой полости у мышей BALB/c с АР, получавших экспериментальную АСИТ D1 или sD1

Таким образом, экспериментальная АСИТ во 2-й, 3-й и 4-й группах приводила к выраженному снижению морфологической манифестации АР, что определялось снижением степени деструктивных процессов в эпителии носовой полости. По суммарной выраженности лечебного эффекта экспериментальной АСИТ группы можно расположить в следующем порядке 4-я и 3-я группы > 2-я группа.

В предыдущих исследованиях нами показано, что экстракт из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (D1), химически модифицированный сукцинированием ϵ -групп лизина и превращенный таким образом в мономерный аллергоид (sD1), обладал существенно меньшей аллергенностью по сравнению с немодифицированным экстрактом (D1). В то же время полученный мономерный аллергоид sD1 продолжал демонстрировать выраженную иммуногенность. При иммунизации мышей мономерным аллергоидом sD1 не отмечалось усиление продукции анти-*Der r* IgE, однако наблюдалось существенное возрастание анти-*Der p* IgG1 и IgG2a антительного ответа [12]. Это обстоятельство позволило в данной работе в начальной фазе экспериментальной АСИТ аллергоидом sD1 (3-я, 4-я группы) использовать дозы значительно выше тех, которые применялись при АСИТ немодифицированным D1 (2-я группа), что позволило существенно сократить число инъекций. В результате мы получили некоторое снижение после челленджирования уровней анти-*Der p* IgE и существенное увеличение анти-*Der p* IgG1 и IgG2a антительного ответа.

В данной работе нами была поставлена цель — оценить эффективность экспериментальной АСИТ мономерным аллергоидом sD1 на мышинной модели аллергического ринита. Нами было предложено несколько вариантов проведения АСИТ на модели ринита: инъекционное (подкожное) введение немодифицированного (нативного экстракта) D1, подкожное введение модифицированного sD1

(мономерного аллергоида) и комбинированный вариант – подкожное и сублингвальное введение sD1. Результаты АСИТ мономерным аллергоидом sD1 сравнивали с группой, получавшей АСИТ нативным экстрактом D1 по схеме, предложенной ранее и являющейся экспериментальным аналогом «полуускоренной» схемы (semirush allergen immunotherapy protocol), часто используемой у человека при проведении «классической» инъекционной (подкожной) АСИТ [16, 17]. Парадоксально, но факт, что традиционная («классическая») инъекционная АСИТ аллергенными экстрактами, практикуемая уже более 100 лет, до сих пор используется как «золотой стандарт» при оценке новых препаратов, предназначенных для усовершенствования этого вида лечения [18].

Моделирование ринита проводилось нами экстрактом D1 и включало трехкратную иммунизацию и пятикратное челленджирование выполнением ИНА, что приводило к проявлению признаков АР: наличие немедленной фазы аллергической реакции после контакта с аллергеном (подсчет актов чихания у мышей) и заложенности носа (оценка частоты дыхания). В дальнейшем также оценивались уровни содержания антител в сыворотках крови и наличие гистологических изменений в слизистой оболочке носовой полости, что в сумме позволяет использовать полученные данные для оценки эффективности проведения АСИТ модифицированным клещевым экстрактом. Подсчет частоты чихания у мышей хотя и субъективный, но полезный метод измерения, особенно для тестирования влияния проводимой терапии на механизмы ранней стадии аллергического процесса, например, на высвобождение гистамина [19]. Используемая нами оценка частоты дыхания не является широко распространенным методом (из-за недостаточной распространенности современных неинвазивных плетизмографов), однако известно, что этот показатель хорошо коррелирует с гистаминзависимым ответом и считается аналогичным заложенности носа у человека [20].

Снижение частоты клинических проявлений – один из важных критериев улучшения состояния при АР, и полученные нами данные согласуются с общемировой практикой подобных исследований на мышинных моделях АР [21, 22]. Второй важный аспект, обнаруженный в данном исследовании, это снижение уровня аллерген-специфического IgE и повышение аллерген-специфического IgG1 и IgG2a после инъекционной АСИТ мономерным аллергоидом sD1, что коррелирует с подавлением выраженности клинических симптомов. Это положение согласуется с литературными данными по АСИТ модифицированными аллергенами [23]. Однако в наших экспериментах мы не обнаружили

существенного снижения уровня антител изотипа IgE, особенно после челленджирования, в группе (4-я группа), которая получала комбинированную АСИТ sD1 (инъекционную и сублингвальную), что возможно из-за недостаточной дозы sD1 при сублингвальном введении. Считается, что сублингвальная доза должна существенно (в разы) превышать инъекционную дозу при возможно длительном применении. В работе Rask и соавт. приводятся данные, свидетельствующие о том, что наибольшая эффективность сублингвальных препаратов отмечена при длительном ежедневном их введении [24]. Несмотря на отсутствие снижения IgE у мышей 4-й группы, получавших АСИТ аллергоидом sD1 по комбинированной схеме, у них не наблюдались гистологические признаки воспаления носовой полости, что считается показателем улучшения в аналогичных экспериментальных работах [22].

Считается, что АР и астма не являются типичными проявлениями для животных. Так как у многих видов животных аллергическая реакция явно проявляется только на поверхности кожных покровов и слизистых, то, возможно, заболевания дыхательных путей играют у животных скорее триггерную роль в развитии дерматита. Однако специальными методическими приемами удалось воспроизвести на определенных видах млекопитающих признаки патологии, наблюдаемой у человека при рините и астме, причем ввиду наличия видовых особенностей набор этих признаков у разных представителей млекопитающих будет свой. Такие модели крайне необходимы для доклинического изучения безопасности и эффективности новых противоаллергических средств, включая те, которые разрабатываются для аллерген-специфической иммунотерапии.

Одной из важнейших характеристик любого лекарственного средства является его безопасность. У препаратов аллергоидов она прежде всего обеспечивается сниженной аллергенностью, то есть неспособностью модифицированного аллергена связывать аллерген-специфический IgE на поверхности клеток-мишеней аллергии (в основном тучных клеток и базофилов) и запускать каскад аллергических реакций. Следует отметить тот факт, что используемые аллергенные экстракты вызывают местные и системные побочные реакции. Так, по данным Nasaroglu и соавт., местные побочные реакции при инъекционной АСИТ нативными аллергенными экстрактами составляли 0,38%, а системные – 0,1% (на 14 308 инъекций), причем местные реакции наблюдались в основном в фазе наращивания дозы, тогда как системные – при поддерживающей дозе. Кроме того, отмечено, что побочные реакции чаще наблюдались у пациентов, получавших АСИТ аллерговакцинами из клещей

домашней пыли, содержащими несколько компонентов аллергенных экстрактов [25]. Вместе с тем, по данным Американской академии аллергии, астмы и иммунологии (American Academy of Allergy, Asthma and Immunology) и Американского колледжа астмы, аллергии и иммунологии (American College of Asthma, Allergy and Immunology), в период с 2008-го по 2013 г. зарегистрированы 4 смертельных случая от АСИТ на 28 млн инъекций. Общий процент системных реакций при инъекционной АСИТ составил 1,9%, тогда как при сублингвальной АСИТ — 1,4% [26]. Приведенные данные по побочным реакциям при АСИТ свидетельствуют о том, что разработка новых безопасных и эффективных аллерговакцин более чем востребована.

В данном исследовании мы наблюдали местные побочные реакции при подкожном введении высоких доз нативного экстракта D1 во 2-й группе, получавшей АСИТ немодифицированным D1. В то же время в 3-й и 4-й группах, получавших инъекции мономерного аллергоида sD1, не отмечено ни местных, ни системных реакций на всем протяжении курса АСИТ. Это свидетельствует о преимуществе аллергоидной формы перед нативным аллергенным экстрактом с точки зрения безопасности. Кроме этого, преимущество мономерного аллергоида заключается также и в его эффективности, которая достигается меньшим числом инъекций.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что АСИТ мономерным аллергоидом из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus*, полученным методом сукцинирования, может быть эффективным и безопасным подходом к терапии АР, включая проведение комбинированного курса инъекционной и сублингвальной АСИТ, что может повысить эффект лечения и в конечном счете — качество жизни пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

- Akdis M. New treatments for allergen immunotherapy. World Allergy Organization Journal. 2014, v. 7, p. 23-27.
- Howarth P., Malling H.J., Molimard M., Devillier P. Analysis of allergen immunotherapy studies shows increased clinical efficacy in highly symptomatic patients. Allergy. 2012, v. 67, p. 321-327.
- Курбачева О.М., Ильина Н.И. Лечение аллергического ринита: когда, как и зачем? Рос. Аллергол. Журн. 2006, № 2, с. 66-75.
- Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. Lancet. 1911, v. 1, p. 1572-1573.
- Freeman J. Further observation of the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccines. Lancet. 1911, v. 2, p. 814-817.
- Nelson H.S. Allergen Immunotherapy. Where is it now? J. Allergy Clin. Immunol. 2007, v. 119, p. 769-777.
- Epstein T.G., Liss G.L., Murphy-Berendts K., Bemstein D.I. Risk factors for fatal and nonfatal reactions to subcutaneous immunotherapy: National surveillance study on allergen immunotherapy (2008-2013). Ann. Allergy, Asthma, Immunol. 2016, v. 116, p. 354-359.
- Бабахин А.А., Гушин И.С., Андреев С.М. и соавт. Химическая модификация аллергена, ведущая к изменению его эпитопной активности. Пат. физиол. 1999, № 1, с. 17-20.
- Platt-Mills T.A. The future of allergy and clinical immunology lies in evaluation, treatment and research on allergic disease. J. Allergy Clin. Immunol. 2002, v. 110, p. 565-566.
- Platt-Mills T.A., Ervin E.A., Heymann P.W., Woodfolk J.I. Pro: The evidence for a causal role of dust mites in asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2009, v. 180, p. 109-121.
- Cui Y. Structural biology of mite allergens. Mol. Biol. Resp. 2013, v. 40, p. 681-686.
- Бабахин А.А., Ласкин А.А., Смирнов В.В. и соавт. Мономерный аллергоид из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*: иммунологические свойства. Рос. Аллергол. Журн. 2016, № 4-5, с. 29-36.
- Бабахин А.А., Ласкин А.А., Камышников О.Ю. и соавт. Модель экспериментальной бронхиальной астмы, индуцированной у мышей аллергенным экстрактом из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*. Рос. Аллергол. Журн. 2015, № 6, с. 25-33.
- Лилли Р.Д. Руководство «Патогистологическая техника и практическая гистохимия» (пер. с англ.). М., 1969, 646 с.
- Ennis D.P., Cassidy J.P., Mahon B.P. Acellular Pertussis Vaccine Protects against Exacerbation of Allergic Asthma Due to Bordetella pertussis in a Murine Model. Clin. Diagnostic. Lab. Immun. 2005, v. 3, p. 409-417.
- Van Oosterhout A.J., van Esch B., Hofman G., Hofstra C.L., van Ark I., Nijkamp F.P., Weller F.R. Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a murine model of allergic asthma. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1998, v. 4, p. 622-628.
- Jenssen E.M., van Oosterhout A.J., van Rensen A.J. et al. Modulation of Th2 responses by peptide analogues in a murine model of allergic asthma: amelioration or deterioration of the disease process depends on Th1 or Th2 skewing characteristics of the therapeutic peptide. J. Immunol. 2000, v. 164, p. 580-588.
- Durham S.R., Nelson H. Allergen immunotherapy: A Centenary celebration. WAO Journal. 2011, v. 4, p. 104-106.
- Takahashi Y., Kagawa Y., Izawa K. et al. Effect of histamine H₄ receptor antagonist on allergic rhinitis in mice. Int. Immunopharmacol. 2009, v. 9, p. 734-738.
- Wagner J.G., Harkema J.R. Rodent models of allergic rhinitis: Relevance to human pathophysiology. Curr. Allergy Asthma Rep. 2007, v. 7, p. 134-140.
- Shin J.H., Kim B.Y., Park H.R., Kim S.W. The effect of pneumococcal polysaccharide vaccine in a mouse model of allergic rhinitis. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2013, v. 148, p. 383-390.
- Tasaniyananda N., Chaisri U., Tungtrongchitr A. et al. Mouse model of cat allergic rhinitis and intranasal liposome-adjuncted refined Fel d 1 vaccine. PLoS One. 2016, v. 11, e0150463c.

23. Huang C.F., Wu T.C., Chu Y.H. et al. Effect of neonatal sublingual vaccination with native or denatured ovalbumin and adjuvant CpG or cholera toxin on systemic and mucosal immunity in mice. *Scand. J. Immunol.* 2008, v. 68, p. 502-510.
24. Rask C., Brimnes J., Lund K. Shorter dosing intervals of sublingual immunotherapy lead to more efficacious treatment in a mouse model of allergic inflammation. *Scand J. Immunol.* 2010, v. 71, p. 403-412.
25. Nacaroglu H.T., Erdem S.B., Sumer O. et al. Local and systemic reactions to subcutaneous allergen immunotherapy: Ten years' experience in a pediatric clinic. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2016, v. 116, p. 349-353.
26. Epstein T.G., Liss G.L., Murphy-Berendts K., Bemstein D.I. Risk factors for fatal and nonfatal reactions to subcutaneous immunotherapy: National surveillance study on allergen immunotherapy (2008-2013). *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2016, v. 116, p. 354-359.

Статья поступила 10.08.2016 г., принята к печати 05.12.2016 г.
Рекомендована к публикации О.М. Курбачевой

ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY WITH MONOMERIC ALLERGOID FROM HOUSE DUST MITES *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* IN A MOUSE ALLERGIC RHINITIS MODEL

Laskin A.A., Babakhin A.A., Kamishnikov O.Y., Gushchin I.S., Khaitov M.R.
Institute of Immunology, Moscow, Russia

Key words: allergenic extract, monomeric allergoid, experimental allergen-specific immunotherapy, mouse allergic rhinitis model

Background. The aim of this study was to investigate the efficacy of the allergen-specific immunotherapy (ASIT) with monomeric allergoid (sD1) obtained by succinylation of the allergenic extract from house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) (D1) in experimental mouse allergic rhinitis model (MARM).

Materials and methods. BALB/c mice were immunized with non-modified extract D1 from house dust mite *D. pteronyssinus* (*Der p*) in mixture with aluminum hydroxide [Al(OH)₃] three times in a three week intervals and then in 6 weeks after the last immunization were challenged with allergenic extract D1 by intranasal administration. Experimental ASIT was performed during the interval between the last immunization and the beginning of challenge. The first group of animals was treated with «sham ASIT» receiving of 16 subcutaneous (s.c.) injections of phosphate-buffered saline (PBS); the second group received 16 s.c. injections of non-modified D1 in increasing doses (in protein equivalent): 1; 10; 100 and 1000 µg/mouse; the third group received 8 s.c. injections of sD1 in increasing doses (in protein equivalent): 100; 550 and 1000 µg/mouse; the fourth group received combined ASIT consisted of 4 s.c. injections of sD1 in doses (in protein equivalent): 100; 550; 1000 µg/mouse and 4 sublingual (s.l.) administrations of sD1 in a dose of 1000 µg/mouse. The fifth group served as a negative control and received sham immunization, ASIT and challenge with PBS. Immediately after the last challenge and 24 hours later the clinical signs of MARM: sneezings (counts per minute) and breath frequency (assessed by non-invasive plethysmography) were evaluated. 48 hours after the last challenge animals of all groups were sacrificed and necessary material (whole head) was collected for histological assessment of the severity of allergic rhinitis in the nasal cavity. To obtain sera samples blood was collected from all groups of animals three times: 7 days after final immunization, 1 day before the challenge and 24 hours after the last challenge. Levels of anti-*Der p* IgE, IgG1, IgG2a in individual sera samples were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. It is shown that all three variants of ASIT (groups 2, 3, 4) significantly reduced the number of sneezing acts. The greatest decrease was seen in the group 3 which was treated s.c with monomeric allergoid sD1. The number of respiratory acts per minute in the animals of groups 2 and 4 treated with non-modified D1 and monomeric allergoid sD1 (combined ASIT – s.c. and s.l. administration) respectively, were significantly higher than that of group 1 (MARM). The levels of anti-*Der p* IgE in groups 1, 2, 3 and 4 were increased after the 3rd immunization in comparison with group 5 (negative control). After ASIT the levels of anti-*Der p* IgE in groups 2, 3 and 4 were elevated in compare to group 5 (negative control) and group 1 (positive control – MARM). However, after the challenge the highest levels of anti-*Der p* IgE were observed in groups 1 and 4, while in group 3 we saw a moderate decrease of anti-*Der p* IgE and in the group 2 the levels of anti-*Der p* IgE were significantly lower than that of group 1 (MARM). The levels of anti-*Der p* IgG1 were significantly increased in groups 2, 3, 4 during and after ASIT as well as after challenge. The levels of anti-*Der p* IgG2a in groups 3 and 4 demonstrated a trend of increasing after ASIT. Anti-*Der p* IgG2a levels in group 4 after the challenge were significantly higher than that of group 1 (MARM). Histological evaluation has shown that overall inflammation, mucous exudation, hyperplasia of the mucosa in the nasal cavity were expressed significantly in groups 1 and 2 in comparison with group 5 (negative control). At the same time group 2 demonstrated a slight reduction of features designated above, and in groups 3 and 4 (ASIT with sD1 and combined s.c/s.l. ASIT, respectively) we observed a complete suppression of these inflammation parameters.

Conclusion. These data indicate that ASIT with monomeric allergoid from house dust mite *D. pteronyssinus* obtained by succinylation may be a novel safe and effective approach for the treatment of allergic rhinitis including carrying out of combined course of injectable and sublingual therapy that may enhance the effect of treatment and patients' quality of life.