C57bl/6 хулганад үүсгэсэн I хэлбэрийн хэт мэдрэгших урвалын загварт cpg odn, овальбумины холимгийн нөлөөг эд, эс судлалын шинжилгээгээр үнэлсэн дүн

Г.Ням-Очир[1,2], Ч.Оюун-Эрдэнэ[1], Н.Өлзий-Орших[4], Б.Уранчимэг[5], Б.Галиндэв[6], Э.Баярмаа[3], С.Хашчулуун[1], Ч.Хүсэлт-Од[1], Г.Энхтүшиг[1], С.Энхтуяа[1],Т.Өлзийхүү[1], Г.Батбаатар[1], С.Цогтсайхан[1], Б.Ариунзаяа[1,5], Ч.Гансүх[1*], Л.Энхсайхан[1,6*]

[1]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Дархлаа судлалын тэнхим

[2]АШУҮИС, Сувилахуйн сургууль, Анагаахын суурь шинжлэх ухааны тэнхим

[3]АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль, Эмгэг судлал, шүүх эмнэлгийн тэнхим

[4]УНТЭ, Эмнэлзүй, эмгэг судлалын нэгдсэн лаборатори

[5] АШУҮИС, Монгол Япон эмнэлэг, Эмнэлзүйн нэгдсэн лаборатори

[6]АШУҮИС, Био-анагаахын хүрээлэн

Email: nyamochir@mnums.edu.mn Утас: 88084593

**Эдгээр судлаачид энэ судалгаанд ижил хувь нэмэр оруулсан*

Түлхүүр үг:
Харшил, үрэвслийн оноо, урьдчилан сэргийлэлт, эозинофил эс

Товч утга

Үндэслэл: Харшлын шалтгаант өвчлөл дэлхийн хүн амын дунд улам бүр өсөн нэмэгдэж байгаа бөгөөд гуурсан хоолойн багтраа, харшлын ринит, конъюктивит, дерматит зэрэг олон хэлбэрээр илэрдэг. Сүүлийн жилүүдэд CpG ДНХ-ийн ODN хэлбэрийг харшлын өвөрмөц дархлаа эмчилгээ болон урьдчилан сэргийлэлтэд ашигласан судалгаа ихээр хийгдэж байгаа бөгөөд харшлын өвчний урьдчилан сэргийлэлтийг боловсронгуй болгохын тулд аллергенийг адъюванттай хавсран болон дангаар хэрэглэн туршиж аллерген өвөрмөц урьдчилан сэргийлэлтийн чиглэлийн суурь судалгааг цаашид өргөжүүлэн хийх шаардлагатай байна.

Зорилго: Хулганад үүсгэсэн I хэлбэрийн хэт мэдрэгших урвалын загварт CpG ODN, овальбумины холимгийн аюулгүй байдал болон мэдрэггүйшүүлэх нөлөөг эс, эд судлалын шинжилгээгээр үнэлэх

Арга, аргачлал: Туршилтыг АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын сургууль, АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын хүрээлэн, АШУҮИС-ийн Монгол Япон Эмнэлгийн Эмгэг судлалын тасгийг түшиглэн хийж гүйцэтгэв. Судалгаанд 6-8 долоо хоногтой C57BL/6 үүлдрийн хулганыг Saline, Ovalbumin, CpG, CpG+Ovalbumin гэсэн бүлэг болгон туршилтын эхний болон 7, 14 дэх өдөр хулганыг мэдээгүйжүүлэн CpG1826, овальбумины холимог уусмалыг хамарт дусааж мэдрэггүйшүүлэлт хийсэн. **Үр дүн:** Туршилтын 15 дахь өдрийн эс судлалын шинжилгээнд Ovalbumin бүлэгт нийт эсийн тоо олширч, цөөн тооны эозинофил эс илэрсэн бусад бүлэгт өөрчлөлт илрээгүй. Эд судлалын шинжилгээгээр уушги болон хамрын хөндийд туршилтын бүх бүлэгт ямар нэг үрэвслийн өөрчлөлт илрээгүй. Туршилтын 44 дэх өдөр эс судлалын шинжилгээнд Saline, CpG+Ovalbumin бүлэгт үрэвслийн өөрчлөлт ажиглагдаагүй. Харин CpG, Ovalbumin бүлэгт нийт эсийн тоо олширч, цөөн тооны эозинофил эс илэрсэн. Эд судлалын шинжилгээнд Saline бүлэгт ямар нэг үрэвслийн эс тодорхойлогдоогүй. CpG+Ovalbumin бүлэгт бронхиол нь бортогон хучуураар хучигдсан, алаг цоог цөөн тооны нейтрофил, лимфоцит эсийн нэвчдэс илэрсэн бол судасны ханыг тойрон алаг цоог цөөн тооны үрэвслийн эсийн нэвчдэс тодорхойлогдов.

Хамрын хөндийн эдэд Ovalbumin-аар үйлчилсэн бүлэгт салст давхаргын доор цөөн тооны эозинофил эсийн нэвчдэс илэрсэн, цус зогсонгошил, бага зэрэг хавагналтын шинж илэрч, салс ялгаралт нэмэгдсэн. Бусад бүлэгт өөрчлөлт илрээгүй.

Дүгнэлт: CpG ODN-ийг хамрын дусаалгаар хэрэглэхэд хор нөлөө ажиглагдаагүй бөгөөд аллергентэй хавсруулан мэдрэггүйшүүлэлтэд хэрэглэхэд дангаар хэрэглэснээс илүү үр нөлөөтэй болохыг харуулж байна.

Үндэслэл: Харшлын шалтгаант өвчлөл буюу I хэлбэрийн хэт мэдрэгших урвалаар үүсгэгдсэн эмгэг дэлхийн хүн амын дунд улам бүр өсөн нэмэгдэж байгаа бөгөөд гуурсан хоолойн багтраа, харшлын ринит, конъюктивит, дерматит зэрэг олон хэлбэрээр илэрдэг.

Орчин үед хотжилт, хэт төвлөрлөөс шалтгаалсан агаар, орчны бохирдол нэмэгдэж амьсгалын замын харшлын шалтгаант өвчлөл нэмэгдэн харшлын ринит, астмын хавсарсан хам шинж (CARAS- Combined allergic rhinitis and asthma syndrome) байдлаар тохиолдох нь ихэссэн. Харшлын риниттэй хүмүүсийн 40% нь гуурсан хоолойн багтраа өвчтэй байдаг ба багтраатай хүмүүсийн 94% нь харшлын риниттэй байдаг. [1, 2]

CpG ДНХ нь тодорхой ДНХ-ийн дараалалд агуулагдах метилжээгүй цитозин, гуаниний динуклеотид агуулсан ДНХ-ийн богино молекулууд юм. Эмгэгтөрөгчид илрэх CpG ДНХ-г дархлааны эсийн TLR9 рецептор таньж холбогддог. [3]2,3, which depend on the presence of unmethylated CpG dinucleotides in the bacterial DNA. In contrast, mammalian DNA has a low frequency of CpG dinucleotides, and these are mostly methylated; therefore, mammalian DNA does not have immuno-stimulatory activity. CpG DNA induces a strong T-helper-1-like inflammatory response4,5,6,7. Accumulating evidence has revealed the therapeutic potential of CpG DNA as adjuvants for vaccination strategies for cancer, allergy and infectious diseases8,9,10. Despite its promising clinical use, the molecular mechanism by which CpG DNA activates immune cells remains unclear. Here we show that cellular response to CpG DNA is mediated by a Toll-like receptor, TLR9. TLR9-deficient (TLR9-/-

TLR9-ээр дамжин өрнөх өвөрмөц бус дархлааны хариу урвал нь Th1 хамааралт эсийн дархлааны урвалыг маш хүчтэй эрчимжүүлэн антиген өвөрмөц эсрэгбиеийн нийлэгжил, өвөрмөц CD8+ Т эсийг өдөөдөг. [4]

Харшил, астмын үед хучуур эсийн доор фиброз, сорвижилт өөрчлөлт, коллаген ширхгийн хуримтлал нь өвчнийг хүндрүүлэх, архагшуулах нэг хүчин зүйл болдог. TGFβ (Transforming growth factor) цитокин нь Т зохицуулагч (Т reg) эсээс ялгардаг бөгөөд харшил, астмын үед Th2 эсийн үйл ажиллагааг зохицуулдаг. [5,6]

Харшлын ринит ба астмын хавсарсан хам шинж (CARAS-Combined allergic rhinitis and asthma syndrome) нь лабораторийн нөхцөлд туршилтын амьтанд үүсгэж хэрэглэдэг харшлын загварын нэг юм. Уг загварыг гуурсан хоолойн багтаа болон харшлын ринитийн суурь судалгаа болон эмийн бэлдмэл турших, вакцины үр дүнг үнэлэхэд хэрэглэдэг.

Харшлын өвчний үед дархлааны Th1 хамааралт хариу урвал дарангуйлагдаж, Th2 эсийн оролцоот хариу урвал идэвхжин, В эсээс IgE нийлэгжих нь ихсэж, эмнэлзүйн шинж илэрдэг. Харин CpG ODN-ийг хэрэглэхэд Th1 хамааралт урвал идэвхжин, Th2 хамааралт урвал дарангуйлагдаж, В эсээс ялгарах IgE нийлэгжил буурдаг.

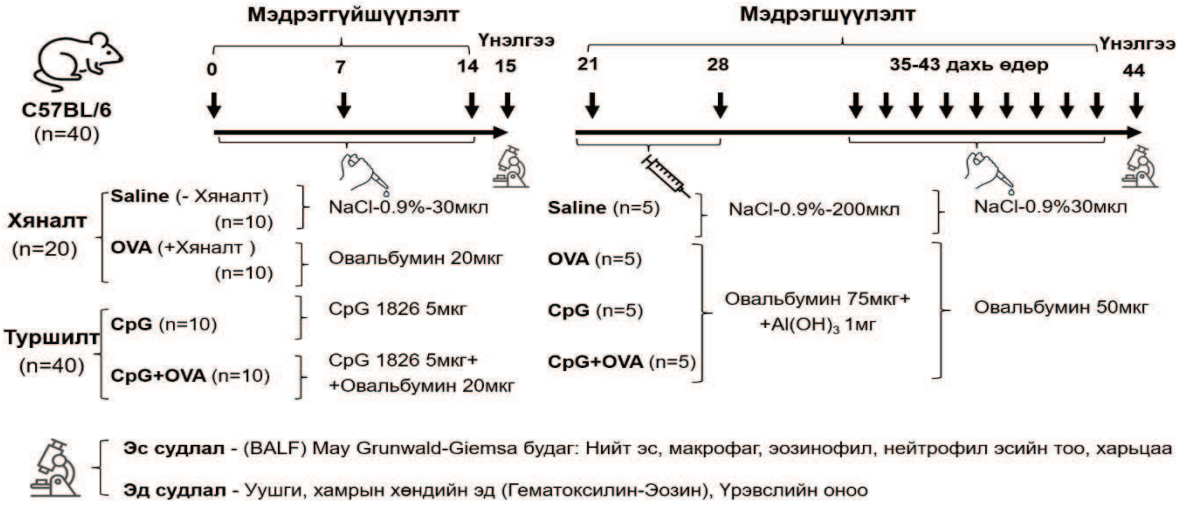
Сүүлийн жилүүдэд CpG ДНХ-ийн ODN хэлбэрийг харшлын өвөрмөц дархлаа эмчилгээ болон урьдчилан сэргийлэлтэд ашигласан судалгаа ихээр хийгдэж байна. CpG ODN нь А, В, С гурван төрөлтэй бөгөөд В, С төрлийг харшлын эмчилгээний туршилтанд хэрэглэж байна. [9]

Гуурсан хоолойн багтраа үүсгэсэн хулганыг CpG ODN-ээр эмчлэхэд Th2 хамааралт урвал саарч, Гоблетийн эсийн гиперплазийг бууруулж, харшлын үеийн хурц үрэвслийн урвалыг дарангуйлж, эозинофил эсийн тоо, Th2 цитокины ялгаралт, ийлдэс дэх IgE-ийн хэмжээг бууруулдаг. [10]

Харшлын үеийн өвөрмөц дархлаа эмчилгээ (Specific immunotherapy-SIT), харшлын антиген өвөрмөц урьдчилан сэргийлэлт нь шинж тэмдгийн эмчилгээнээс давуу талтай бөгөөд харшлын эмгэгийн үеийн дархлааны хариу урвалын зохицуулгад нөлөөлж эмнэлзүйн шинж тэмдгийг удаан хугацаанд багасгах нөлөөтэй байдаг. [11, 12]

Зорилго: CpG-ODN-ийг дангаар болон аллергентай хослуулан харшлын I хэлбэрийн хэт мэдрэгших урвалын өвөрмөц аллерген урьдчилан сэргийлэлтэд туршин үр нөлөө, ашуулгүй байдлыг үнэлэх зорилгоор уг судалгаа хийлээ.

Арга, аргачлал: Судалгаанд АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын хүрээлэнгийн Туршилтын амьтны төвд үржүүлдэг 6-8 долоо хоногтой 18.0-22.0 гр жинтэй C57BL/6 үүлдрийн хулганыг ашиглав. Хулганыг тогтмол 22±3°C хэмтэй өрөөнд байрлуулан ус болон тэжээлээр хангаж хоногийн 12 цаг гэрэлтэй, 12 цаг харанхуй мөчлөгтэй ижил орчинд тэжээсэн. Туршилтын амьтдыг хяналтын (Saline, Ovalbumin), туршилтын (CpG, CpG+Ovalbumin хавсарсан) гэсэн 4 бүлэг болгон бүлэг тус бүрт 10 нийт 40 толгой хулгана ашигласан. (Зураг 1)



Зураг 1. Судалгааны арга зүйн бүдүүвч.

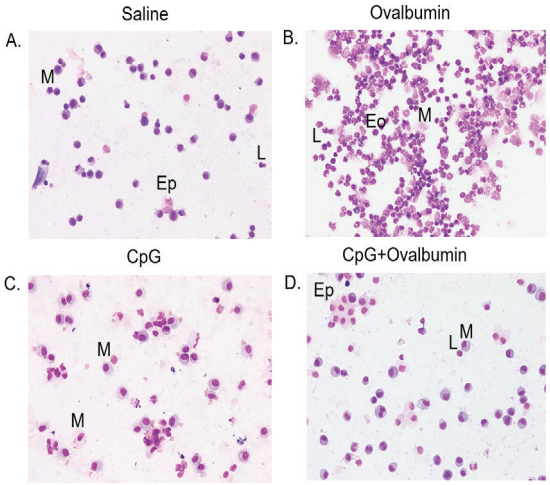
CpG ODN болон аллергенээр урьдчилан мэдрэггүйшүүлэлт хийхдээ хяналтын болон туршилтын бүлгийн хулганад эхний болон 7, 14 дахь өдөрт халдвар хамгаалал, биоаюулгүй ажиллагааны дүрмийг баримтлан туршилтийг дараах байдлаар гүйцэтгэв. Saline бүлгийн хулгануудад натрийн хлорид (NaCl)-ын 0.9%-ийн уусмал, Ovalbumin бүлгийн хулганад овальбумин (EKEAR® LOT# EK200616) 20 мкг, туршилтын CpG бүлгийн хулганад B бүлгийн CpG-ODN 1826 (5’-tccatgacgttcctgacgtt-3’)-ийг 5 мкг, CpG+Ovalbumin хавсарсан бүлгийн хулганад B бүлгийн CpG-ODN 1826-г 5 мкг, овальбумин 20 мкг хэмжээтэй агуулсан нийт 30 мкл хэмжээтэй уусмалыг хамарт дусаав.

Аллергенээр мэдрэгшүүлэхдээ туршилтын 21 болон 28 дахь өдөр хяналтын Saline бүлгийн хулгануудад натрийн хлорид (NaCl)-ын 0.9%-ийн уусмал 200мкл, бусад бүлгийн хулганы хэвлийн хөндийд 1 мг $Al(OH)_3$-д (Alhydrogel Invivogen) эмульсжүүлсэн 75 мкг овальбумин агуулсан 200мкл хэмжээтэй уусмалыг тарьсан.

I хэлбэрийн хэт мэдрэгшлийн урвалыг үүсгэхдээ туршилтын 35-43 дахь өдөрт /нийт 9 удаа/ хяналтын Saline бүлгийн хулгануудад натрийн хлорид (NaCl)-ын 0.9%-ийн уусмал, бусад бүлгийн хулганад овальбумин 50 мкг хэмжээтэй агуулсан 30 мкл хэмжээтэй уусмалыг хамарт дусаав.

Туршилтын 15 болон 44 дэх өдөр бүлэг тус бүрээс 5 хулганыг амьсгалын замд гарсан өөрчлөлтийг тодорхойлох зорилгоор 2.5% изофлуран ашиглан егүүтгэж цээжний хөндийг нээн зүрхний баруун ховдолд хатгалт хийн цусыг авч, гуурсан хоолойн угаадсын шингэнийг (BALF) авч цитоспин наац бэлтгэв. Мөн амьсгалын замаас уушги, хамрын хөндийн эдийг авч эд судлалын шинжилгээ хийн үрэвслийг (0 оноо - хэвийн, 1 оноо - цөөн тооны эсүүд, 2 оноо – 1 дан үрэвслийн эсийн нэвчдэс, 3 оноо - 2-4 давхар үрэвслийн эсийн нэвчдэс, 4 оноо - > 4 давхар үрэвслийн эсийн нэвчдэс) оноог шалгууруур үнэлэв.

Үр дүн: CpG ODN, овальбумины холимгийн аюулгүй байдлыг үнэлсэн үр дүн: Бид эхний ээлжинд C57BL6-д үүсгэсэн харшлын загварт хамарт дусаахад ямар үйлдэл үзүүлж буйг тодорхойлов. Туршилтын 15 дахь хоногт Saline, CpG, CpG+Ovalbumin бүлгийн хулганад гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын шингэний эс судлалын шинжилгээг хийхэд үрэвслийн урвал ажиглагдаагүй. Харин Ovalbumin бүлэгт нийт эсийн тоо олширч, цөөн тооны эозинофил эс илэрсэн (Зураг 2). Үүнээс үзэхэд туршилт эхэлснээс хойш 15 хоногийн дараа хулганы уушгинд үрэвслийн урвал хүчтэй илрээгүй. (Зураг 2)



Зураг 2. Гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын шингэний эс судлалын зураг.

(Туршилтын 15 дахь өдөр) Будаг: ***Мэй-Грюнвальд, Гимзийн***)- (Өсгөлт: 40х)

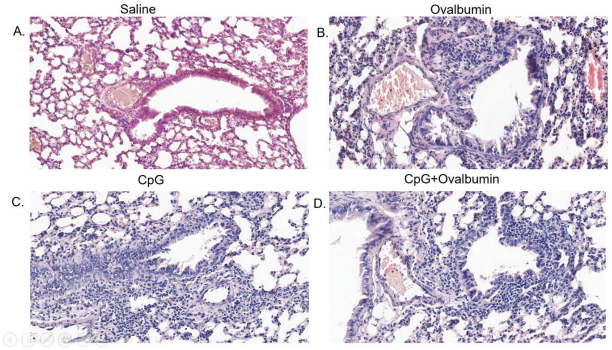
A, C, D Saline, CpG, CpG+Ovalbumin бүлгийн

хулганы гуурсан хоолойн цулцангийн угаадсын шингэнд үрэвслийн эсүүд илрээгүй. Цулцангийн макрофаг, гуурсан хоолойн хучуур эсүүд харагдаж байна.

B. Ovalbumin бүлгийн хулганы гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын шингэнд цулцангийн макрофаг, лимфоцит, нейтрофиль, эозинофил холимог эсүүд харагдаж байна.

Тайлбар. M-макрофаг эс, L-Лимфоцит, Eo-Эозинофил, Ep-хучуур эс, M-макрофаг эс, L-Лимфоцит

Уушгины эд судлалын шинжилгээнд Saline бүлгийн хулганад ямар нэг үрэвслийн эс тодорхойлогдоогүй бол Ovalbumin, CpG, CpG+Ovalbumin хавсарсан бүлгийн хулганы уушгины эдийн бүтэц хадгалагдсан, бронхиолын ханын хучуур доор зарим хэсэгт цөөн тооны үрэвслийн эсийн нэвчдэс илэрсэн, судаснууд цус дүүрэлттэй байсан (Зураг 3).



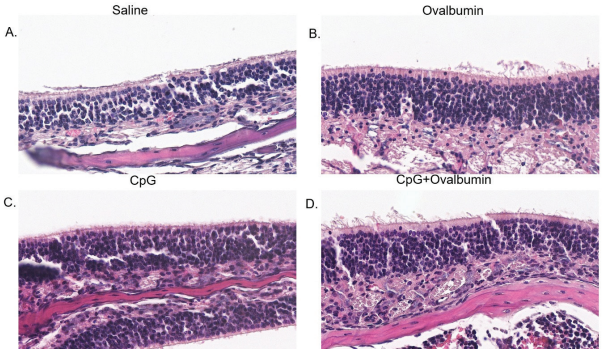
Зураг 3. Уушгины эд судлалын зураг.

(Туршилтын 15 дахь өдөр) Будаг: Гематоксилин-Эозин (Өсгөлт: 40x)

A. Saline бүлгийн хулганы уушгины эдийн бичил бүтэц хадгалагдсан, цулцан агааараар тэлэгдсэн. Бронхиол бортогон хучуураар хучигдсан, хөндий болон хананд ямар нэг үрэвслийн эс тодорхойлогдохгүй.

B, C, D. Ovalbumin, CpG, CpG+Ovalbumin бүлгийн хулганы уушгины эдийн бүтэц хадгалагдсан, уушгины цулцан агааараар тэлэгдсэн. Бронхиолын ханын хучуур доор зарим хэсэгт цөөн тооны үрэвслийн эсийн нэвчдэс илэрсэн. Судаснууд цус дүүрэлттэй.

Харшлын урвал үүсгэж эхэлснээс хойш 15 хоногийн дараа хулганы хамрын салстад үрэвслийн урвал илрээгүй, намираа хучуур эсийн сормуус хадгалагдсан байв (Зураг 4).



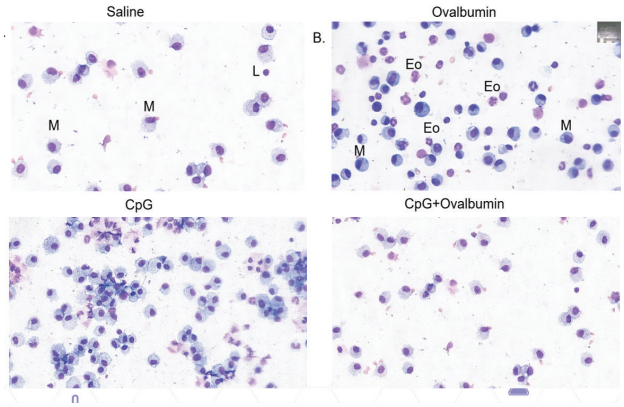
Зураг 4. Хамрын хөндийн эд судлалын зураг.

(Туршилтын 15 дахь өдөр) Будаг: Гематоксилин-Эозин (Өсгөлт: 100x)

A, B, C, D. Туршилтын бүх бүлгийн хулганы хамрын хөндийн эдэд үрэвслийн өөрчлөлт илрээгүй. Намираа хучуур эсүүд хадгалагдсан.

CpG ODN, овальбумины холимгийн мэдрэгүйшүүлэх нөлөөг үнэлсэн үр дүн: C57BL6 хулгануудад харшлын урвал үүсгэж эхэлснээс хойш 44 хоногийн дараа буюу хамрын сүүлийн дусаалгаас 24 цагийн дараа Ovalbumin, CpG дангаар, CpG+Ovalbumin хавсран хэрэглэхэд ямар үйлдэл үзүүлж буйг гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын шингэний эс судлалын шинжилгээг хийж, хулганы хамрын хөндий болон уушгины эдэд тодорхойлсон.

Saline, CpG+Ovalbumin бүлгийн хулгануудад гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын шингэний эс судлалын шинжилгээг хийхэд үрэвслийн урвал ажиглагдаагүй. Харин CpG, Ovalbumin бүлэгт нийт эсийн тоо олширч, цөөн тооны эозинофил эс илэрсэн (Зураг 5).



Зураг 5. Гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын шингэний эс судлалын зураг

(Туршилтын 44 дэх өдөр) Будаг: ***Мэй-Грюнвальд, Гимзийн***)- (Өсгөлт: 40x)

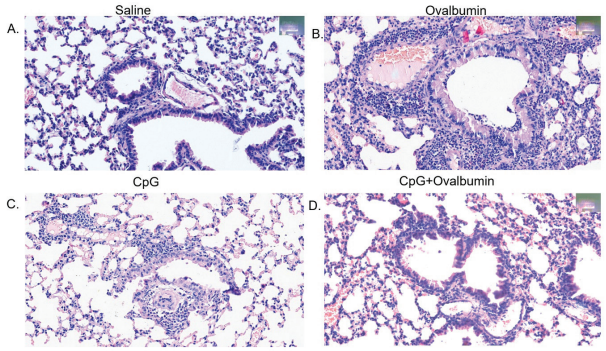
Saline, CpG+Ovalbumin бүлгийн хулганы гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын үрэвслийн эсүүд илрээгүй. Цулцангийн макрофаг, гуурсан

хоолойн хучуур эсүүд харагдаж байна.

Ovalbumin, CpG бүлгийн хулганы гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын шингэнд цулцангийн макрофаг, лимфоцит, нейтрофил, эозинофил холимог эсүүд харагдаж байна.

Salineхэрэглэсэнхяналтынбүлгийнхулганууддаг ямар нэг үрэвслийн эс тодорхойлогдоогүй бол овальбумин хэрэглэсэн бүлэгт үрэвслийн урвал илэрсэн. Тухайлбал дунд, жижиг бронхиолыг тойроод лимфоцит, нейтрофил, эозинофил эсийн нэвчдэс илэрсэн, дунд болон жижиг артерийн судас цус дүүрсэн, түүнийг тойроод үрэвслийн эсийн нэвчдэс илэрсэн байв.

CpG дангаар хэрэглэсэн бүлэгт бронхиолын эргэн тойронд цөөн тооны эозинофил, нейтрофил, лимфоцит эсийн нэвчдэс илэрсэн бол CpG+Ovalbumin хавсарсан бүлэгт бронхиол нь бортогон хучуураар хучигдсан, хөндий болон хананд цөөн тооны үрэвслийн эс тодорхойлогдов (Зураг 6).



Зураг 6. Уушгины эд судлалын зураг.
(Туршилтын 44 дэх өдөр)

Будаг: Гематоксилин-Эозин (Өсгөлт: 40х)

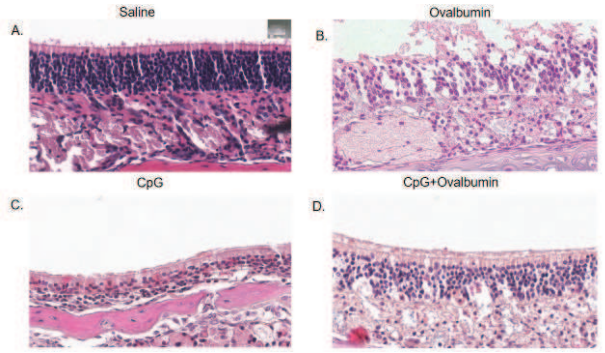
A. Saline бүлгийн хулганы бронхиол нь бортогон хучуураар хучигдсан, хөндий болон хананд ямар нэг үрэвслийн эс тодорхойлогдоогүй.

B. Ovalbumin бүлэгт дунд, жижиг бронхиолыг тойроод лимфоцит, нейтрофил, эозинофил эсийн нэвчдэстэй. Дунд болон жижиг артерийн судаснууд цус дүүрэлттэй, түүнийг тойроод үрэвслийн эсийн нэвчдэс илэрсэн.

C. CpG бүлэгт бронхиолын эргэн тойронд эозинофил, нейтрофил, лимфоцит эсийн нэвчдэс илэрсэн. Судасны ханыг тойрон цөөн тооны үрэвслийн эсийн нэвчдэс илэрсэн.

D. CpG+Ovalbumin бүлэгт бронхиол нь бортогон хучуураар хучигдсан, хөндий болон хананд цөөн тооны үрэвслийн эс тодорхойлогдсон.

Туршилтын 44 хоногийн дараа хамрын хөндийн эдийг шинжлэхэд Ovalbumin бүлгээс бусад хулганад үрэвслийн өөрчлөлт илрээгүй. Намираа хучуур эсүүд хадгалагдсан байв. Овальбумин хэрэглэсэн бүлэгт салст давхаргын доор цөөн тооны эозинофил эсийн нэвчдэс илэрсэн, цус зогсонгошил, бага зэрэг хавагналтын шинж илэрч, салс ялгаралт нэмэгдсэн (Зураг 7). Үүнээс үзэхэд уушгины эд дэх үрэвслийн урвал овальбумин хэрэглэсэн бүлэгт их байсан бол хамрын салст хэсэгт үрэвслийн урвал салс ялгарал нэмэгдэх, бага зэрэг хавагнах байдлаар илэрч байна.

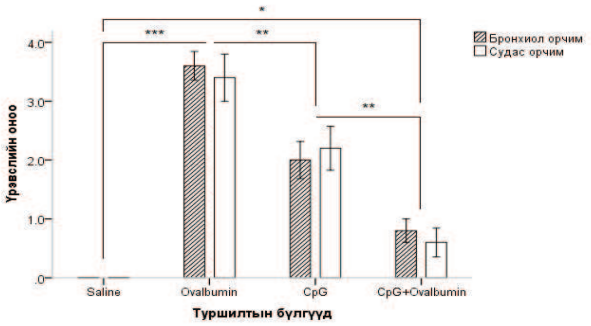


Зураг 7. Хамрын хөндийн эд судлалын зураг.

(Туршилтын 44 дэх өдөр) Будаг: Гематоксилин-Эозин (Өсгөлт: 100х) Туршилтын бүх бүлгийн хулганы хамрын хөндийн эдэд үрэвслийн өөрчлөлт илрээгүй. Намираа хучуур эсүүд хадгалагдсан. Ovalbumin бүлэгт салст давхаргын доор цөөн тооны эозинофил эсийн нэвчдэс илэрсэн, цус зогсонгошил, бага зэрэг хавагналтын шинж илэрч, салс ялгаралт нэмэгдсэн.

Мөн туршилтын дөрвөн бүлгийн уушгины эдэд бронхиол болон судас орчмын үрэвслийн оноог тооцож үзэхэд Saline бүлэгт ямар нэгэн үрэвслийн эсийн нэвчдэс илрээгүй буюу үрэвслийн оноо тооцогдоогүй. Харин Ovalbumin бүлэгт үрэвслийн оноо бусад бүх бүлгээс харьцангуй өндөр гарсан. ($p<0.01$)

CpG+Ovalbumin бүлгийг Saline бүлэгтэй харьцуулахад үрэвслийн оноо статистик ач холбогдолтой ялгаа ажиглагдсангүй ($p<0.93$) CpG дангаар хэрэглэсэн бүлэгт CpG+Ovalbumin бүлэгтэй харьцуулахад үрэвслийн оноо ялгаатай ($p<0.05$) байлаа (Зураг 8). CpG дангаар үрэвслийн урвалыг бууруулахгүй байгаа ч CpG+Ovalbumin хавсран хэрэглэхэд харшлын үед үрэвслийн урвалыг бууруулж байгаа нь ажиглагдлаа. (Зураг 8)



Зураг 8. Туршилтын бүлэгт үрэвслийн оноо тооцсон дүн
(Туршилтын 44 дэх өдөр)

Хэлцэмж: Манай орны хувьд харшлын загварыг амьтан дээр туршсан судалгаа хомс байдаг бөгөөд бидний судалгаа нь өөрийн орны

нөхцөлд лабораторийн амьтанд харшлын загвар үүсгэж, түүнээс урьдчилан сэргийлэх эмчилгээний оролдлогыг хийж байгаа онцлогтой юм.

C57BL/6 хулганад овальбумин, хөнгөнцагааны гидроксидын холимгийг хэвлийн хөндийд тарьж мэдрэгшүүлэн, овальбуминийг хамарт дусаан хэрэглэхэд хяналтын бүлэгтэй харьцуулахад гуурсан хоолой, цулцангийн угаадсын шингэний наацад эозинофил эс их хэмжээтэй илэрч, уушгины эдийг шинжлэхэд үрэвслийн эсийн нэвчдэс үүсч бронхиолын ойролцоох бүс болон судасны ойролцоох бүсэд эозинофил, нейтрофил эсийн тоо ихэссэн, гуурсан хоолойд хундаган эсийн тоо олширсон байгаа нь харшлын загвар үүссэнийг илтгэж байна.

CpG-ODN-ийг дангаар болон аллергентэй хавсруулан харшлын өвчний аллерген өвөрмөц дархлаа эмчилгээнд хэрэглэсэн тухай судалгаа олон байдаг боловч урьчилан сэргийлэх зорилгоор туршсан судалгаа хомс байдаг бөгөөд тэдгээрээс жишээ дурвал Nunes нарын 2019 онд хийгдсэн CpG-ODN-ыг *B.trophicalis* хачигны аллергений хамт хөнгөн цагааны гидроксид $Al(OH)_3$-д уусган шингээж, арьсан доор тарьж мэдрэгшүүлэлт хийхэд туршилтын амьтны гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын шингэн дэх нийт эсийн тоо болон эозинофил эсийн тоо, IL-5 цитокины ялгаралт, ийлдсийн нийт IgE, амьсгалын зам дахь үрэвслийн эсийн нэвчдэс, шүүрэл ялгаралт нь харшлын бүлэгтэй (аллерген+$Al(OH)_3$) харьцуулахад бага байжээ.[13]we have previously shown that sensitization in the presence of toll like receptors (TLRs

Бидний судалгаа нь CpG ODN-ийг дангаар болон овальбумин уурагтай хавсруулан хамрын дусаалга хэлбэрээр хэрэглэж байгаагаар нь аллерген болон хэрэглэх аргын хувьд дээрх судалгаанаас ялгаатай.

Харин уушгины цулцангийн хөндий, таславчинд үрэвслийн эсийн нэвчдэс бага байсан нь овальбумины үйлчилсэн замаас хамаарч уушгины эдийн шинжилгээнд гарах эмгэг өөрчлөлт харилцан адилгүй байна гэсэн Dong Im King нарын 2019 онд хийгдсэн судалгааны үр дүнтэй ижил үр дүнг үзүүлж байна.[14]

Мөн CpG ДНХ-ийн ODNs хэлбэрээр эмчилгээ хийхэд Гоблетийн эсийн гиперплазийг бууруулж, шүүрэл ялгаралтыг багассанаар харшлын үеийн хурц үрэвслийн урвалыг дарангуйлжээ.[15]

CpG-ODNs-ыг хамрын дусаалгаар хэрэглэхэд амьсгалын доод замын TSLP (Thymic stromal lymphopoietin)-г бууруулан, Th2 хамааралт цитокины түвшин, гуурсан хоолой цулцангийн угаадсын шингэн дэх эозинофилийн эзлэх хувь, IL-4 ба IL-5 концентраци, ийлдсийн овальбумин өвөрмөц IgE, бронхиол орчмын үрэвслийн зэрэг болон эмнэлзүйн шинжийг мэдэгдэхүйц бууруулсан байна. [16]

Туршилтын хулганад (BALB/C) овальбуминаар үүсгэгдсэн харшлын эмгэг загварт CpG ДНХ-ийн ODNs (oligodeoxynucleotides) хэлбэрийг хэрэглэхэд Th2 хамааралт урвал саарч байсан тухай тэмдэглэжээ. [10]

Харшлын ринит ба астмын хавсарсан хам шинж (CARAS-Combined allergic rhinitis and asthma syndrome)-ийн үед CpG-ODNs-г глюкокортикоид эмчилгээтэй хавсарч хэрэглэх нь дангаар хэрэглэснээс илүү үр дүнтэй болох нь тогтоогдсон байна. [17]

А бүлгийн CpG ODN хэрэглэхэд харшлын шинж арилж, эмчилгээ дууссаны дараа 38 долоо хоногийн турш намжмал байдалд байсан тухай бичжээ (Senti et al, 2009). [18]

CpG ODN-ийг харшил төрүүлэгч аллергентэй хавсран хэрэглэхэд эмчилгээний үр дүн сайжирч байгаа нь бидний судалгааны үр дүнтэй ойролцоо байна. [19]

Бидний судалгаа нь хэт мэдрэгших I хэлбэрийн урвалын суурин дээр үүсэх амьсгалын хариу урвалын өөрчлөлтийг үнэлэх зориулалтын флетизмографийн шинжилгээний багажийг ашиглаагүй, дархлаа судлалын шинжилгээний үр дүнгүүдийг тусгаагүй байгаа зэрэг хязгаарлагдмал талтай юм.

Гэсэн хэдий ч эс судлалын шинжилгээний аргаар хэт мэдрэгших I хэлбэрийн урвалын үед амьсгалын замд гарах өөрчлөлтийг туршилтын бүлэгт харьцуулж үзсэнээр CpG ODN, овальбумины холимгийн хэт мэдрэгших урвалаас урьдчилан сэргийлэх нөлөөг үнэлэхэд үнэ цэнтэй мэдээллийг өгч чадна гэж үзэж байна.

Дүгнэлт:

1. CpG ODN 1826 хэрэглэхэд харшлын урвалыг өдөөхгүй, харин үрэвслийн хариу урвалыг бага зэрэг өдөөж байгаа нь CpG ODN-ийг харшлын өвчний үеийн аллерген өвөрмөц урьдчилан сэргийлэлтийн туршилтанд ашиглахад аюулгүй болох нь харагдаж байна.
2. Овальбумин бүлгийн хулганы уушгины эдэд эозинофил эс агуулсан үрэвслийн эсийн нэвчдэс үүссэн байгаа нь I хэлбэрийн хэт мэдрэгших урвалын амьтны загвар үүссэн байгааг илтгэж байна
3. CpG ДНХ-ийг дангаар хэрэглэхэд харшлын урвалыг саатуулах үйлдэл хангалтгүй байна. Хэт мэдрэгших урвалаас урьдчилан сэргийлэхэд CpG ODN-ийг аллергентэй хавсруулан мэдрэггүйшүүлэлтэд хэрэглэх нь дангаар хэрэглэснээс илүү үр нөлөөтэй болохыг харуулж байна.

Талархал: Энэхүү судалгааг БШУЯ, ШУТС санхүүжилт бүхий “Харшлын эмчилгээнд CpG DNA хэрэглэн үр дүнг тооцох судалгаа” сэдэвт (ШуСс 2020/19) төслийн хүрээнд хийж гүйцэтгэв. Уг судалгааг гүйцэтгэхэд дэмжлэг, туслалцаа үзүүлсэн АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын сургуулийн Дархлаа судлалын тэнхим, АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын хүрээлэн, АШУҮИС-ийн Монгол-Япон Эмнэлгийн Эмгэг судлалын Тасаг, АШУҮИС-ийн Био-Анагаахын сургуулийн Эмгэг судлал, Шүүх эмнэлгийн тэнхим, УНТЭ-ийн Эмнэлзүй, эмгэг судлалын нэгдсэн лабораторийн хамт олонд болон тусалж дэмжсэн бүх хүмүүст талархал илэрхийлье.

Ном зүй:

1. *Leynaert B, Neukirch F, Demoly P, Bousquet J. Epidemiologic evidence for asthma and rhinitis comorbidity. J Allergy Clin Immunol. 2000;106:S201–5. doi: 10.1067/mai.2000.110151.*
2. *Bergeron C, Hamid Q. Relationship between Asthma and Rhinitis: Epidemiologic, Pathophysiologic, and Therapeutic Aspects. Allergy Asthma Clin Immunol Off J Can Soc Allergy Clin Immunol. 2005;1(2):81-87. doi:10.1186/1710-1492-1-2-81*
3. *Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740-745. doi:10.1038/35047123*
4. *Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. Nat Rev Drug Discov. 2006;5(6):471-484. doi:10.1038/nrd2059*
5. *Cho JY, Miller M, Baek KJ, et al. Inhibition of airway remodeling in IL-5–deficient mice. J Clin Invest. 2004;113(4):551-560. doi:10.1172/JCI19133*
6. *Nakao A, Miike S, Hatano M, et al. Blockade of Transforming Growth Factor ␣/Smad Signaling in T Cells by Overexpression of Smad7 Enhances Antigen-induced Airway Inflammation and Airway Reactivity. :8.*
7. *Kitagaki K, Jain VV, Businga TR, Hussain I, Kline JN. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on established th2 responses. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(6):1260-1269. doi:10.1128/cdli.9.6.1260-1269.2002*
8. *Deo SS, Mistry KJ, Kakade AM, Niphadkar PV. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. Lung India Off Organ Indian Chest Soc. 2010;27(2):66-71. doi:10.4103/0970-2113.63609*
9. *Vollmer J, Krieg AM. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61(3):195-204. doi:10.1016/j.addr.2008.12.008*
10. *Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. J Immunol Baltim Md 1950. 1998;160(6):2555-2559.*
11. *Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2006;6(10):761-771. doi:10.1038/nri1934*
12. *Linhart B, Valenta R. Vaccines for allergy. Curr Opin Immunol. 2012;24(3):354-360. doi:10.1016/j.coi.2012.03.006*
13. *Nunes FPB, Alberca-Custódio RW, Gomes E, et al. TLR9 agonist adsorbed to alum adjuvant prevents asthma-like responses induced by Blomia tropicalis mite extract. J Leukoc Biol. 2019;106(3):653-664. doi:10.1002/JLB.MA1218-475RR*
14. *Kim DI, Song MK, Lee K. Comparison of asthma phenotypes in OVA-induced mice challenged via inhaled and intranasal routes. BMC Pulm Med. 2019;19(1):241. doi:10.1186/s12890-019-1001-9*
15. *Serebrisky D, Teper AA, Huang CK, et al. CpG Oligodeoxynucleotides Can Reverse Th2-Associated Allergic Airway Responses and Alter the B7.1/B7.2 Expression in a Murine Model of Asthma. J Immunol. 2000;165(10):5906-5912. doi:10.4049/jimmunol.165.10.5906*
16. *Li H tao, Chen Z gui, Liu H, et al. Treatment of allergic rhinitis with CpG oligodeoxynucleotides alleviates the lower airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma syndrome via a mechanism that possibly involves in TSLP. Exp Lung Res. 2016;42(6):322-333. doi:10.1080/01902148.2016.1215571*
17. *Li H tao, Chen Z gui, Lin Y sen, et al. CpG-ODNs and Budesonide Act Synergistically to Improve Allergic Responses in Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome Induced by Chronic Exposure to Ovalbumin by Modulating the TSLP-DC-OX40L Axis. Inflammation. 2018;41(4):1304-1320. doi:10.1007/s10753-018-0779-6*
18. *Senti G, Johansen P, Haug S, et al. Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. Clin Exp Allergy. 2009;39(4):562-570. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03191.x*
19. *Tighe, H., Takabayashi, K., Schwartz, D., Marsden, R., Beck, L., Corbeil, J., Richman, D. D., Eiden, J. J., Jr, Spiegelberg, H. L., & Raz, E. (2000). Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity. European journal of immunology, 30(7), 1939–1947. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200007)30:7<1939::AID-IMMU1939>3.0.CO;2-#.*

Evaluation of effects of CpG ODN and ovalbumin mixture on type I hypersensitivity reaction model induced in C57BL/6 mice by histological and cytological analysis

Nyam-Ochir G[1,2], Oyun-Erdene Ch[1], Ulziy-Orshikh N[4], Uranchimeg B[5], Galindev B[6], Bayarmaa E[3], Khaschuluun S[1], Enkhtushig G[1], Khuselt-Od Ch[1], Enkhtuya S[1], Ulziikhuu T[1], Batbaatar G[1], Tsogtsaikhan S[1], Ariunzaya B[1,5], Gansukh Ch[1], Enhsaikhan L[1,6*]*

[1]Department of Immunology, School of Bio-Medicine, MNUMS

[2]Department of Basic Medical Sciences, School of Nursing, MNUMS

[3]Department of Pathology and Forensic Medicine, School of Bio-Medicine, MNUMS

[4]General Laboratory of Medicine and Pathology, State First Central Hospital

[5]Central Clinical Laboratory, Mongolia-Japan Hospital, MNUMS

[6]Institute of Biomedical Sciences, MNUMS

Email: nyamochir@mnums.edu.mn

Tel:+976-88084593

Keywords:
Allergy
inflammatory score
Prevention
Eosinophil cells

Background: Allergic diseases are increasingly prevalent worldwide, presenting in various forms such as asthma, allergic rhinitis, conjunctivitis, and dermatitis, characterized by type I hypersensitivity reactions. Recent years have witnessed substantial research into the utilization of CpG ODN for allergy-specific immunotherapy and prevention. To advance the prevention strategies for allergic diseases, there is a pressing need to expand basic research into allergen-specific prevention through the investigation of allergens in isolation and in combination with adjuvants. **Aim:** This study aims to evaluate the safety and desensitizing effects of a CpG ODN and ovalbumin mixture in a murine model of type I hypersensitivity through cytological and histological analyses. **Materials and methods:** C57BL/6 mice aged 6-8 weeks and weighing 18.0-22.0 g were categorized into Saline, Ovalbumin, CpG, and CpG+Ovalbumin groups on the first, 7th, and 14th days of the experiment. Nasal instillation of a mixed solution containing CpG 1826 and ovalbumin was administered to anesthetized mice. Sensitization was induced intraperitoneally with ovalbumin emulsified in Al(OH)3 on days 21 and 28, followed by nasal instillation of ovalbumin from days 35 to 43 to establish a hypersensitivity reaction model. Bronchial and vascular inflammation scores were computed on the 15th and 44th days of histological analysis.

Results: Cytological analysis on the 15th day demonstrated increased total cell count solely in the Ovalbumin group, with minimal eosinophil presence in the other groups. Histological examination revealed no inflammatory changes in lung and nasal cavity tissues across all experimental groups. By the 44th day, no inflammatory changes were observed in the Saline and CpG+Ovalbumin groups. However, the CpG and Ovalbumin groups exhibited increased total cell counts with a few eosinophil cells detected. Histological examination unveiled:
- In the Ovalbumin group, infiltration of lymphocytes, neutrophils, and eosinophils around medium and small bronchioles, accompanied by blood stasis, swelling, and increased mucus secretion.
- In the CpG group, sparse eosinophils, neutrophils, and lymphocytic infiltration around bronchioles, with minimal inflammatory cell infiltrates around vessel walls.

-In the CpG+Ovalbumin group, bronchioles covered with squamous epithelium, along with a minor presence of neutrophils and lymphocytes, and patchy inflammatory cell infiltrates surrounding vessel walls.

Nasal tissue analysis indicated modest eosinophilic cell infiltration beneath the mucous layer, blood stasis, slight swelling, and increased mucus secretion solely in the Ovalbumin group, with no significant changes observed in the other groups.

Conclusion: This study demonstrates the safety of CpG ODN when administered via nasal instillation and highlights its enhanced effectiveness when combined with allergens compared to standaloneuse for desensitization.