

ИММУНОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНСАКАРА

А.А. СТЕПАНОВ

аспирант

М.В. АРИСОВ

Научный руководитель – доктор ветеринарных наук

*Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии
им. К.И. Скрябина, 117218, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28,
e-mail: vigis@ncport.ru*

Изучены иммунотоксические свойства препарата инсакар. По результатам реакции гиперчувствительности замедленного типа индекс стимуляции у животных, получавших инсакар из расчета 0,02 и 0,2 мл на голову, составил соответственно 9,45 и 9,79 в отличие от 10,18 в контроле, что позволяет заключить, что препарат не угнетает Т-клеточное звено иммунной системы. Накожное однократное применение инсакара в терапевтической и десятикратно увеличенной терапевтической дозах не оказывает негативного действия на гуморальный иммунный ответ.

Ключевые слова: инсакар, иммунитет, гиперчувствительность, гемагглютинация, мыши.

Воспроизведение реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) дает представление о способности лекарственных препаратов влиять на продукцию сенсibilизированными лимфоцитами медиаторов разнонаправленного действия, вовлекающих клетки системы мононуклеарных фагоцитов в иммунный ответ. Эффекты ГЗТ образуются при контакте сенсibilизированных лимфоцитов с соответствующим антигеном в присутствии макрофагов.

При оценке действия лекарственного препарата на иммунную систему информативным показателем является интенсивность продукции антител против тимусзависимого антигена, которая дает представление о функциональной активности трех клеточных систем – Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и их взаимодействия.

Цель наших исследований – определение иммунотоксических свойств инсакара.

Материалы и методы

Клеточный иммунитет у экспериментальных животных при обработке испытуемым препаратом оценивали при воспроизведении реакции ГЗТ по методу Kitamura [4]. Продукцию медиаторов клеточного иммунного ответа эффекторными клетками ГЗТ стимулировали эритроцитами барана. Титр антител определяли в реакции гемагглютинации (РГА), основанной на специфическом склеивании (лютинировать) Аг-несущих частиц, специфическими антителами, которые выработаны при сенсibilизации и содержащимися в сыворотке крови [1–5].

Исследования проводили в лаборатории иммунологии ВИГИС. Кровь для получения эритроцитов барана (ЭБ) брали путём венопункции в стеклянную банку, помешивали до образования пены в течение 15 мин, фильтровали через капроновый фильтр и затем добавляли консервант Олсфера (глюкоза –

2,05 г, цитрат натрия – 0,8, хлорид натрия – 0,42 г, дистиллированная вода – 100 мл) в соотношении 1 : 1. Полученную кровь хранили в холодильнике.

Отмывание ЭБ. В две центрифужные пробирки добавляли по 3 мл крови и до 10 мл физиологического раствора (0,8 %), затем уравнивали на весах. Центрифугировали при 1500 об. в течение 10–15 мин. Далее верхнюю часть супернатанта отсасывали пастеровской пипеткой и вновь добавляли физиологический раствор, взбалтывали и помещали в центрифугу. Процедуру повторяли 3–4 раза до образования прозрачного супернатанта, который также отсасывали.

Получение 3-ного раствора ЭБ. В мерный стакан вместимостью 100 мл добавляли 0,83%-ный физиологический раствор (примерно 40 мл), затем – 3 мл отмытых ЭБ и доводили общий объем до 100 мл.

Влияние препарата на клеточный иммунный ответ определяли по реакции ГЗТ. Для постановки реакции сформировали 3 группы (по 10 голов) мышей СВА массой тела 18 г, которых иммунизировали однократно тимусзависимым антигеном путем внутрибрюшинного введения 0,5 мл 2%-ной суспензии ЭБ на стерильном 0,15 М растворе NaCl. Затем мышей первой и второй группы обработали инсакаром в дозах из расчета соответственно 0,02 мл и 0,2 мл (десятикратно увеличенная доза) на голову. Мыши третьей группы служили контролем и препарат не получали.

На пятые сутки после сенсibilизации в подушечку правой задней лапы мышей вводили антиген в дозе 0,05 мл 4%-ной суспензии ЭБ. В контрольную (контрольную) лапу вводили 0,15 М раствор NaCl в том же объеме. Степень местной воспалительной реакции оценивали через 24 ч после инъекции по разнице массы опытной (M_o) и контрольной (M_k) лап. Обе лапы обрезали сразу после окончания опыта методом цервикальной дислокации выше пяточного сустава, но ниже сочленения малой и большой берцовых костей. Индекс реакции (ИР) ГЗТ вычисляли для каждой мыши по формуле:

$$ИР = M_o - M_k / M_k.$$

Для постановки РГА сформировали 3 группы (по 10 голов) мышей СВА массой тела 18 г, которых иммунизировали (сенсibilизировали) однократно тимусзависимым антигеном путем внутрибрюшинного введения 0,5 мл 2%-ной суспензии ЭБ на стерильном 0,15 М растворе NaCl. Затем мышей первой и второй группы обработали инсакаром в дозах из расчета соответственно 0,02 мл и 0,2 мл (десятикратно увеличенная доза) на голову. Мыши третьей группы служили контролем и препарат не получали.

Кровь для получения сыворотки брали на 7-е сутки после иммунизации мышей ЭБ (максимум накопления специфических антител крови) путем декапитации и получали сыворотку. Полученную сыворотку в возрастающем разведении добавляли в 96 луночных плоскодонных планшетов, приготовив двукратные разведения исследуемой сыворотки в объеме 0,5 мл, начиная с разведения 1 : 10. В контрольную лунку вносили 0,5 мл физиологического раствора. После этого ко всем лункам добавляли 0,5 мл 1%-ной суспензии ЭБ. Учет реакции вели после инкубации планшетов в термостате в течение 2 ч при 37 °С. При положительном результате эритроциты оседают на дне лунки планшета в виде зонтика, при отрицательном – в виде пуговки. За титр принимают последнее разведение исследуемой сыворотки, при котором имеется положительный результат. Контрольная лунка должна быть отрицательной.

Для сравнения выраженности ответов различных животных в опыте и контроле определяли индекс действия (ИД) препаратов, который представляет собой отношение титра антител в опыте к величине титра антител в контроле. Значение индекса действия 0,7 и менее свидетельствует об иммуносупрессивной активности испытуемых препаратов и их комбинаций. Величина индекса действия 1,3 и более соответствует иммуностимулирующему действию.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «STUDENT 200». Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

1. Оценка Т-клеточного звена иммунной системы.

Результаты изучения степени воспалительной реакции через 24 ч после инъекции по разнице массы опытной и контрольной лап приведены в таблицах 1–3.

1. Индекс реакции мышей контрольной группы через 24 ч после инъекции

Масса лап, мг		Индекс реакции
правой (опыт)	левой (контроль)	
141	130	8,46
143	131	9,16
152	140	8,57
147	131	12,21
149	133	12,03
160	147	8,84
154	138	11,56
147	130	13,07
142	131	8,39
161	147	9,52
В среднем		10,18±1,33

2. Индекс реакции мышей первой подопытной группы (доза 0,02 мл/гол.) через 24 ч после инъекции

Масса лап, мг		Индекс реакции
правой (опыт)	правой (опыт)	
140	127	10,23
143	131	9,16
144	131	9,92
152	141	7,80
137	123	11,13
147	135	8,80
149	137	8,75
153	139	10,07
142	131	8,39
161	146	10,27
В среднем		9,45±0,74

3. Индекс реакции мышей второй подопытной группы (доза 0,2 мл/гол.) через 24 ч после инъекции

Масса лап, мг		Индекс реакции
правой (опыт)	правой (опыт)	
167	154	8,44
146	132	10,60
139	124	12,09
157	145	8,27
150	136	10,29
146	130	12,30
141	130	8,46
151	138	9,42
144	133	8,27
141	129	9,30
В среднем		9,79±1,07

В результате исследований установлено, что индекс стимуляции (ИС) у животных первой группы составил 9,45, второй – 9,79, а в контроле – 10,18. Полученные данные позволяют заключить, что инсакар не угнетает Т-клеточное звено иммунной системы.

2. Реакция прямой гемагглютинации.

Результаты изучения способности организма животных к антителопродукции против тимусзависимого антигена при введении испытуемого препарата приведены в таблицах 4–7.

Установлено, что накожное однократное применение инсакара в терапевтической и десятикратно увеличенной терапевтической дозах не вызывает изменение интенсивности антителопродукции против тимусзависимого антигена. Титр гемагглютининов в сыворотке крови животных, получивших различные дозы испытуемого препарата, не отличался от такового в контроле.

4. Титры гемагглютининов в сыворотке крови животных, получивших инсакар в дозе 0,02 мл/кг накожно однократно

№ животного	Результаты РГА	
	титр антител	log $\frac{1}{2}$ титра антител
1	1/64	6,0
2	1/32	5,0
3	1/64	6,0
4	1/64	6,0
5	1/64	6,0
6	1/64	6,0
7	1/32	5,0
8	1/32	5,0
9	1/64	6,0
10	1/64	6,0
В среднем		5,7±0,34

5. Титры гемагглютининов в сыворотке крови животных, получивших инсакар в дозе 0,2 мл/кг накожно однократно

№ животного	Результаты РГА	
	титр антител	log $\frac{1}{2}$ титра антител
1	1/64	6,0
2	1/64	6,0
3	1/64	6,0
4	1/32	5,0
5	1/32	5,0
6	1/32	5,0
7	1/64	6,0
8	1/64	6,0
9	1/32	5,0
10	1/32	5,0
В среднем		5,5±0,37

6. Титры гемагглютининов в сыворотке крови животных, не получивших препарат

№ животного	Результаты РГА	
	титр антител	log $\frac{1}{2}$ титра антител
1	1/64	6,0
2	1/64	6,0
3	1/64	6,0
4	1/32	5,0
5	1/64	6,0
6	1/32	5,0
7	1/32	5,0
8	1/32	5,0
9	1/64	6,0
10	1/64	6,0
В среднем		5,6±0,36

На толерантность гуморального иммунного ответа к действию инсакара в испытанных дозах указывают также индексы действия препарата (табл. 7).

7. Интенсивность антителопродукции против тимусзависимого антигена у мышей при подкожном применении инсакара

Группа животных	Доза препарата, мл/кг	Кратность введения	log ½ титра антител	ИД
1	0,02	Однократно	5,7±0,34	1,01
2	0,2	Однократно	5,5±0,37	0,98
Контроль	–	–	5,6±0,36	–

Таким образом, инсакар в испытанных дозах не обладает иммунотоксическими свойствами.

Литература

1. Даугалиева Э.Х. и др. Методические рекомендации по изучению влияния антгельминтиков на иммунный статус животных при гельминтозах. – М., 1989. – 25 с.
2. Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1987.
3. Хаитов Р.М. и др. Методические указания по изучению иммуотропной активности фармакологических веществ. – 1998. – 34 с.
4. Kitamura K. A footpad weight assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse // Immunol. Methods. – 1980. – V. 39, № 3. – P. 277–283.
5. Sever J.L. Application of a micro-technique to viral serological investigations // J. Immunol. – 1962. – V. 88, № 1. – P. 398–413.

Immunotoxic properties of insacar

A.A. Stepanov

Immunotoxic properties of insacar are studied. By the results of reaction of hypersensitivity of the slowed-down type the stimulation index at the animals receiving insacar at the dose of 0,02 and 0,2 ml made respectively 9,45 and 9,79 unlike 10,18 in control that allows to conclude that the drug doesn't oppress the T-cellular link of immune system. Single application of insacar on skin in therapeutic and ten times increased therapeutic doses has no negative effect on the humoral immune answer.

Keywords: insacar, immunity, hypersensitivity, gemagglutination, mice.