

ИММУНОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 5%-НОЙ СУСПЕНЗИИ КОКЦИДОНА

Д.С. ПОСЕЛОВ

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: arisov@vniigis.ru

Изучены иммунотоксические свойства 5%-ной суспензии кокцидона в двух тестах. По результатам реакции гиперчувствительности замедленного типа индекс реакции у животных, получавших препарат в терапевтической дозе 0,4 мл/кг, составил 11,46, у животных, получавших 10-кратную дозу, – 11,31, а у животных контрольной группы – 14,26, что позволяет сделать вывод об отсутствии угнетающего действия 5%-ной суспензии кокцидона на Т-клеточное звено иммунной системы. Накожное однократное применение препарата в терапевтической и десятикратно увеличенной дозах не вызывает изменения интенсивности антителопродукции против тимусзависимого антигена. Индекс действия препарата в обеих дозах составил 0,98. Реакция гемагглютинации не выявила отрицательного влияния препарата на гуморальный иммунный ответ.

Ключевые слова: иммунотоксичность, кокцидон, иммунитет, гиперчувствительность, гемагглютинация, мыши, реакция.

Иммунотоксические свойства препарата «Кокцидон суспензия 5 %» оценивали на основе способности организма экспериментальных животных к индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и выработки антител в ответ на введение тимусзависимого антигена.

Клеточный иммунитет у экспериментальных животных при введении испытуемого препарата оценивали при воспроизведении реакции гиперчувствительности замедленного типа по методу Kitamura (1980). Воспроизведение реакции 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. Продукцию медиаторов клеточного иммунного ответа эффекторными клетками ГЗТ стимулировали эритроцитами барана.

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 совместном воздействии.

Цель нашей работы – изучить иммунотоксические свойства 5%-ной суспензии кокцидона.

Материалы и методы

Титр антител определяли в реакции гемагглютинации (РГА), основанной на специфическом склеивании антиген-несущих частиц эритроцитов барана (ЭБ) специфическими антителами, которые вырабатаны при сенсibilизации и содержатся в сыворотке крови [1-5]. Кровь для получения ЭБ брали путём венопункции в стеклянную банку. Отбивали фибрин путем помешивания до образования пены в течение 15 мин, фильтровали через капроновый фильтр и затем добавляли консервант Олсфера, состоящий из глюкозы – 2,05 г, цитрата натрия – 0,8 г, хлорида натрия – 0,42 г и дистиллированной воды – 100 мл в соотношении 1 : 1. Полученную кровь хранили в холодильнике.

Отмывание ЭБ проводили следующим образом. В две центрифужные пробирки добавляли по 3 мл крови и до 10 мл физиологического раствора (0,83 %), 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.

Для получения 3%-ного раствора ЭБ в мерный стакан вместимостью 100 мл добавляли 40 мл 0,83%-ного физиологического раствора, затем добавляли 3 мл отмывых ЭБ и доводили общий объём до 100 мл.

Для постановки реакции ГЗТ и РГА было сформировано по три группы мышей-самцов линии СВА × С57 BL/6 по 10 голов массой тела 18 г. Животным первой группы вводили препарат в дозе 0,4 мл/кг перорально, однократно (терапевтическая доза). Животным второй группы вводили дозу 4 мл/кг перорально, однократно (десятикратная терапевтическая доза). Животные третьей группы препарат не получали и служили контролем.

В реакции ГЗТ всех животных подопытных групп иммунизировали интраперитонеально оптимальной дозой тест-антигена – тимусзависимый антиген – нативные ЭБ. Антиген вводили в объёме 0,5 мл 3%-ной суспензии ЭБ в стерильном физиологическом растворе. Для выявления сенсibilизации мышей на 5-е сутки в подушечку правой задней лапы вводили разрешающую дозу антигена в объёме 50 мкл 15%-ной суспензии ЭБ в физиологическом растворе (опыт) В контрлатеральную лапу вводили физиологический раствор в том же объёме. О степени выраженности воспалительной реакции на месте инъекции антигена судили по приросту массы лап через 24 ч.

О клеточной реакции формирования ГЗТ судили по величине сдвига индекса реакции (ИР), выраженного в процентах. Индекс реакции вычисляли для каждой мыши по формуле:

$$\text{ИР} = \frac{M_o - M_k}{M_k} \times 100,$$

где M_o – масса опытной лапы; M_k – масса контрольной лапы.

Контролем служили неиммунизированные мыши, получившие только разрешающую дозу антигена.

В РГА интенсивность продукции антител против тест-антигена после введения испытуемого препарата изучали в опытах на мышах, иммунизированных интраперитонеально оптимальной дозой антигена. В качестве антигена использовали нативные ЭБ. Антиген вводили однократно внутрибрюшинно в объёме 0,5 мл 3%-ной суспензии ЭБ на стерильном физиологическом растворе. Испытуемый препарат вводили после иммунизации, т. е. в индуктивную фазу иммунного ответа. Титр антител определяли на пике первичного иммунного ответа (7-е сутки после иммунизации) в микроварианте прямой РГА (Sever, 1962). Титр антител выражали в виде $\log \frac{1}{2}$ числа. Для сравнения выраженности иммунного ответа в опыте и контроле определяли индекс действия препарата (ИД), который представляет собой отношение титра антител в опыте к величине титра антител в контроле. Статистическую обработку проводили с помощью программы «STUDENT 200». Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты тестирования способности организма экспериментальных животных к индукции реакции ГЗТ приведены в таблицах 1-3.

1. Реакция ГЗТ (терапевтическая доза 0,4 мл/кг перорально, однократно)

№ животного	Реакция ГЗТ		
	масса правой лапы, мг (опыт)	масса левой лапы, мг (контроль)	ИР, %
1	143,0	131,0	9,16
2	145,0	131,0	10,68
3	149,0	131,0	13,74
4	150,0	128,0	17,18
5	132,0	127,0	3,93*
6	148,0	137,0	8,03
7	159,0	141,0	12,74
8	143,0	129,0	10,85
9	140,0	128,0	9,37
10	162,0	136,0	19,11*
			В среднем 11,46

Примечание. * - показатель выведен из вариационного ряда при статистической обработке.

2. Реакция ГЗТ (десятикратная терапевтическая доза 4 мл/кг перорально, однократно)

№ животного	Реакция ГЗТ		
	масса правой лапы, мг (опыт)	масса левой лапы, мг (контроль)	ИР, %
1	169,0	140,0	20,71*
2	147,0	137,0	7,29
3	141,0	124,0	13,71
4	152,0	138,0	10,14
5	162,0	142,0	14,08
6	155,0	125,0	24,0*
7	153,0	138,0	10,86
8	148,0	132,0	12,12
9	146,0	132,0	10,60
10	153,0	137,0	11,68
			В среднем 11,31

3. Реакция ГЗТ у контрольных животных

№ животного	Реакция ГЗТ		
	масса правой лапы, мг (опыт)	масса левой лапы, мг (контроль)	ИР, %
1	149,0	132,0	12,87
2	154,0	135,0	14,07
3	158,0	147,0	7,48
4	144,0	125,0	15,2
5	165,0	144,0	14,58
6	160,0	132,0	21,21*
7	152,0	130,0	16,92
8	164,0	145,0	13,10
9	160,0	137,0	16,78
10	155,0	132,0	17,42
			В среднем 14,26

Пероральное однократное введение испытуемого препарата в терапевтической и десятикратно увеличенной терапевтической дозе не вызывало ста-

тистически достоверного сдвига ИР ГЗТ. Значения ИР не отличались от показателя контроля. Полученный результат указывает на индифферентность клеточного иммунитета к действию испытуемого препарата.

Результаты тестирования способности организма экспериментальных животных к антителопродукции против тимусзависимого антигена при введении испытуемого препарата приведены в таблицах 4-6.

4. РГА у белых мышей при введении кокцидона в терапевтической дозе 0,4 мл/кг перорально, однократно

№ животного	Результаты РГА	
	титр антител	$\log \frac{1}{2}$ титра антител
1	1/32	5,00
2	1/32	5,00
3	1/32	5,00
4	1/32	5,00
5	1/32	5,00
6	1/32	5,00
7	1/64	6,00
8	1/32	5,00
9	1/32	5,00
10	1/32	5,00
		В среднем 5,11

5. РГА у белых мышей при введении кокцидона в десятикратной терапевтической дозе 4 мл/кг перорально, однократно

№ животного	Результаты РГА	
	титр антител	$\log \frac{1}{2}$ титра антител
1	1/32	5,00
2	1/64	6,00
3	1/32	5,00
4	1/64	6,00
5	1/16	4,00
6	1/64	6,00
7	1/16	4,00
8	1/32	5,00
9	1/32	5,00
10	1/32	5,00
		В среднем 5,10

6. РГА у белых мышей при введении кокцидона в десятикратной терапевтической дозе 4 мл/кг перорально, однократно

№ животного	Результаты РГА	
	титр антител	$\log \frac{1}{2}$ титра антител
1	1/32	5,00
2	1/64	6,00
3	1/32	5,00
4	1/32	5,00
5	1/32	5,00
6	1/32	5,00
7	1/64	6,00
8	1/32	5,00
9	1/32	5,00
10	1/32	5,00
		В среднем 5,20

Полученные результаты свидетельствуют о том, что пероральное однократное применение испытуемого препарата в терапевтической и десяти-

кратно увеличенной дозе не вызывает изменений интенсивности антителопродукции против тимусзависимого антигена. Титр гемагглютининов в сыворотке крови животных, получивших различные дозы кокцидона, не отличался от такового в контроле. На толерантность гуморального иммунного ответа к действию кокцидона в испытанных дозах указывают также индексы действия препарата, равные 0,98 (табл. 7).

7. Интенсивность антителопродукции против тимусзависимого антигена у мышей при пероральном введении 5%-ной суспензии кокцидона

Группа животных	Доза препарата, мл/кг	Кратность введения	log $\frac{1}{2}$ титра антител	ИД
I	0,4	Однократно	5,11±0,30	0,98
II	4	Однократно	5,10±0,52	0,98
Контроль		-	5,20±0,30	-

Таким образом, по данным реакции ГЗТ пероральное однократное введение 5%-ной суспензии кокцидона в терапевтической и десятикратно увеличенной дозах не оказывает негативного действия на клеточный иммунитет. По данным РГА пероральное однократное введение препарата в терапевтической и десятикратно увеличенной дозах не оказывает негативного действия на гуморальный иммунный ответ. Препарат в испытанных дозах не обладает иммунотоксическими свойствами.

Литература

1. *Daugalieva E.H. u dr.* Metodicheskie rekomendacii po izucheniju vlijaniya antgel'mintikov na immunnii status zhivotnih pri gel'mintozah. – М., 1989. – 12 s.
2. *Petrov R.V.* Immunologija. – М.: Medicina, 1987. – 387 s.
3. *Haitov R.M. u dr.* Metodicheskie ukazaniya po izucheniju immunotropnoi aktivnosti farmakologicheskikh veschestv. – М., 1998. – 10 s.
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 5 % suspension of Kokcidon

D.S. Poselov

postgraduate

M.V. Arisov

doctor of veterinary sciences

All-Russian Scientific Research Institute of Helminthology named after K.I. Skryabin, 117218, Moscow, B. Chermushkinskaya st., 28, e-mail: arisov@vniigis.ru

Immunotoxic properties of 5 % suspension of kokcidon in two tests are studied. By results of reaction of hypersensitivity of the slowed-down type the reaction index at the animals receiving a preparation in a therapeutic dose of 0,4 ml/kg, has made 11,46, at the animals receiving a 10 times increased dose – 11,31, and at animals of control group – 14,26 that allows to draw a conclusion on lack of oppressing effect of 5 % suspension kokcidon on the T-cellular link of immune system. A single skin application of tested drug in a therapeutic and tenfold increased therapeutic doses doesn't cause changes of intensity of antibody production against a thymus-dependent antigen. The index of action of a preparation in both doses made 0,98. Reaction of gemagglutination didn't reveal negative influence of a preparation on the humoral immune answer.

Keywords: immunotoxicity, kokcidon, immunity, hypersensitivity, gemagglutination, mice, reaction.