

УДК 619:615.37

DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-44-49

Изучение иммуотропной активности супрамолекулярного комплекса фенбендазола

Анастасия Ивановна Варламова^{1,2}, Каринэ Гегамовна Курочкина¹,
Наталья Владимировна Данилевская²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук», 117218, Москва, ул. Б. Черемушkinsкая, 28, e-mail: arspoeb@mail.ru

² Московская Государственная Академия Ветеринарной Медицины и Биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина, 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23

Поступила в редакцию: 02.04.2019; принята в печать: 23.04.2019

Аннотация

Цель исследований: изучение иммуотоксических свойств супрамолекулярного комплекса фенбендазола (СМФ).

Материалы и методы. Изучение иммуотоксических свойств СМФ проводили с применением реакции агглютинации и гиперчувствительности замедленного типа. В каждой опытной группе было по 7–8 мышей линии СВА×С57BL/6 массой 16–18 г. СМФ вводили однократно внутрижелудочно в терапевтической дозе 20 мг/кг по действующему веществу, в десятикратной дозе – 200 мг/кг, базовый препарат – фенбендазол задавали в десятикратно увеличенной дозе – 20 мг/кг. Контрольные группы животных получали крахмальный клейстер. Затем мышей иммунизировали интраперитонеально 3%-ной взвесью эритроцитов барана (тест-антиген) и распределили на 8 групп. Влияние препаратов на антителообразование определяли в реакции гемагглютинации, титр антител в сыворотке крови – в микроварианте прямой реакции гемагглютинации с вычислением индекса реакции. Влияние препарата на клеточный иммунитет устанавливали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к ЭБ.

Результаты и обсуждение. Введение испытуемых препаратов не оказало угнетающего влияния на антителогенез у мышей опытных групп: $6,5 \pm 0,22$; $6,17 \pm 0,47$ и $7,75 \pm 0,25$ ($\log_2$) по сравнению с контролем – $7,67 \pm 0,21$ ($\log_2$). Индексы реакции составили соответственно 0,85; 0,80 и 1,01. Пероральное однократное введение СМФ в терапевтической (20 мг/кг) и в десятикратной терапевтической дозе (200 мг/кг) не оказывало влияния на клеточное звено иммунитета. Сдвиги индекса реакции воспаления у животных составили соответственно $9,05 \pm 3,47$ и $10,05 \pm 2,25\%$. Введение базового препарата стимулировало реакцию ГЗТ, что проявилось увеличением индекса воспаления ($21,06 \pm 3,32\%$) по сравнению с контрольной группой ($9,27 \pm 3,91\%$).

Ключевые слова: супрамолекулярный комплекс, фенбендазол, поливинилпирролидон, эритроциты барана, клеточный и гуморальный иммунный ответ, гемагглютинация, гиперчувствительность замедленного типа, мыши.

Для цитирования: Варламова А. И., Курочкина К. Г., Данилевская Н. В. Изучение иммуотропной активности супрамолекулярного комплекса фенбендазола // Российский паразитологический журнал. 2019. Т. 13. № 2. С. 44–49.

DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-44-49.

© Варламова А. И., Курочкина К. Г., Данилевская Н. В.

Study of the Immunotropic Activity of the Supramolecular Complex of Fenbendazole

Anastasiya I. Varlamova^{1,2}, Karine G. Kurochkina¹, Natalia V. Danilevskaya²

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants – a branch of Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences", 28, B. Cheremushkinskaya street, Moscow, Russia, 117218, e-mail: arspheob@mail.ru

² Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – K. I. Skryabin MBA, 109472, Moscow, Akademika Skryabina str., 23

Received on: 02.04.2019; accepted for printing on: 23.04.2019

Abstract

The purpose of the research is to study the immunotoxic properties of the supramolecular complex of fenbendazole (CMF).

Materials and methods. The study of the immunotoxic properties of SMF was performed using the agglutination reaction and delayed-type hypersensitivity. In each experimental group, there were 7–8 CBA × C57BL / 6 mice weighing 16–18 g. The CMF was administered once intragastrically at a therapeutic dose of 20 mg/kg for the active substance, in a tenfold dose – 200 mg/kg, the basic drug – fenbendazole asked in a tenfold dose of 20 mg/kg. Control groups of animals received starch paste. Then the mice were immunized intraperitoneally with a 3 % suspension of sheep erythrocytes (test antigen) and distributed into 8 groups. The effect of drugs on antibody production was determined in the hemagglutination reaction, the antibody titer in the serum in the microvariant of the direct hemagglutination reaction with the calculation of the reaction index. The effect of the drug on cellular immunity was established in a delayed-type hypersensitivity reaction (DTH) to sheep erythrocytes.

Results and discussion. The introduction of the tested drugs had no inhibitory effect on antibody production in mice of the experimental groups: 6.5 ± 0.22 ; 6.17 ± 0.47 and 7.75 ± 0.25 ($\log_2$) compared with the control – 7.67 ± 0.21 ($\log_2$). Reaction indices were respectively 0.85; 0.80 and 1.01. Oral administration of a single CMF in therapeutic (20 mg/kg) and in a tenfold therapeutic dose (200 mg/kg) did not affect the cellular level of immunity. The shifts in the inflammatory response index in animals were 9.05 ± 3.47 and $10.05 \pm 2.25\%$ respectively. The introduction of the basic drug stimulated the reaction of HRT, which was manifested by an increase in the inflammation index ($21.06 \pm 3.32\%$) compared with the control group ($9.27 \pm 3.91\%$).

Keywords: supramolecular complex, fenbendazole, polyvinylpyrrolidone, sheep erythrocytes, cellular and humoral immune response, hemagglutination, delayed-type hypersensitivity, mice.

For citation: Varlamova A. I., Kurochkina K. G., Danilevskaya N. V. Study of the immunotropic activity of the supramolecular complex of fenbendazole. Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology. 2019; 13 (2): 44–49.

DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-44-49.

Введение

Супрамолекулярный комплекс фенбендазола с водорастворимым полимером был разработан сотрудниками Института элементоорганических соединений им. Н. А. Несмеянова (ИНЭОС РАН, г. Москва) и ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН с применением механохимической технологии в измельчителях ударно-стирающего типа с регулируемой энергонапряжённостью с целью повышения водорастворимости базового препарата - фенбендазола и, как следствие, улучшения его эффективности при гельминтозах

жвачных животных. В качестве полимера был использован – поливинилпирролидон. ПВП представляет собой полимер винилпирролидона с высокой биосовместимостью, который уже длительное время используют в качестве системы доставки плохо растворимых лекарственных средств [10, 12] и для контроля скорости высвобождения лекарственных веществ с целью улучшения параметров их фармакокинетики [11]. Данные физико-химических исследований подтвердили увеличение растворимости полученного комплекса, уменьшение размеров частиц, аморфизацию

субстанции фенбендазола и включение ее в мицеллы ПВП [9]. При оценке параметров острой токсичности установлено, что супрамолекулярный комплекс фенбендазола при энтеральном пути введения белым мышам согласно ГОСТ 12.1.007-76 относится к IV классу малотоксичных веществ [1]. При клиническом испытании СМФ на овцах, спонтанно инвазированных стронгилиями пищеварительного тракта, показал высокую эффективность в дозе 2 мг/кг по ДВ [9].

В связи с тем, что применяемые на практике антигельминтные препараты наряду с терапевтическим действием, могут вызывать изменения в иммунной системе и проявлять иммунотоксические свойства, вызывая дисбаланс в Т- и В-системах иммунитета, что может приводить к дальнейшему снижению резистентности организма [3–6], целью наших исследований было изучение иммуотропной активности супрамолекулярного комплекса фенбендазола. В этом случае эритроциты барана являются тимусзависимым антигеном неинфекционной природы, который обычно используют в иммунологических исследованиях, т.е. препарат вводится в процессе развития специфического иммунного ответа на ЭБ, включающего в себя все этапы иммунного реагирования [2].

Материалы и методы

С целью изучения иммунотоксических свойств СМФ было проведено два опыта на 60 мышах-самцах линии СВАхС57BL/6 массой 16–18 г, в ходе которых было установлено влияние СМФ на гуморальный и клеточный иммунный ответ. 14 мышам препарат вводили однократно внутривентрально через зонд в терапевтической дозе 20 мг/кг по действующему веществу в 1%-ном крахмальном клейстере, 16 мышам – в десятикратно увеличенной дозе – 200 мг/кг, 14 мышам вводили базовый препарат – фенбендазол в десятикратно увеличенной дозе – 20 мг/кг и 16 мышей служили контролем, и препарат не получали. Затем всех животных (60 гол.) иммунизировали интраперитонеально в объеме 0,5 мл 3%-ной взвеси ЭБ (тест-антиген) в стерильном физиологическом растворе и распределили на 8 групп по 7–8 голов в каждой.

Реакция гемагглютинации. Опыт проводили на 30 мышах линии СВАхС57BL/6 массой

16–18 г. После введения испытуемого препарата и иммунизации животных разделили на 4 группы по 7–8 особей в каждой. Титр антител определяли на пике первичного иммунного ответа (7-е сутки после иммунизации) в микроварианте прямой реакции гемагглютинации (РГА). Титр антител выражали в виде $\log_2$ 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. Значения индекса 0,5 и ниже говорят об угнетении антителогенеза, а 1,3 и выше – о стимуляции иммунного ответа.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ). Влияние на Т-клеточный иммунитет *in vivo* оценивают у мышей по реакции ГЗТ к ЭБ. После введения испытуемого препарата и иммунизации животных разделили на 4 группы по 7–8 особей в каждой. На 5-е сутки для выявления сенсibilизации мышам в подушечку правой задней лапы вводили разрешающую дозу ЭБ – 15%-ную взвесь в объеме 0,02 мл, в контралатеральную лапу вводили физиологический раствор в том же объеме. О степени выраженности воспалительной реакции в месте инъекции разрешающей дозы антигена судили по приросту массы лап через 24 ч. Об интенсивности клеточной реакции ГЗТ судят по величине сдвига индекса реакции по формуле:

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

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

Исследования проводили согласно рекомендациям Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005) [8].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента с помощью компьютерной программы STUDENT 200 Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Изменения в иммунной системе под воздействием фармакологических средств можно установить при использовании модели антигенной стимуляции, т. е. при использовании антигенов различной природы, реакцию

на которые лекарственное средство может изменять. Однократное введение исследуемого препарата одновременно с антигеном (ЭБ) позволяет выявить прямое воздействие на клетки иммунной системы [2, 7]. Реакция прямой гемагглютинации основана на способности агглютининов, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных ЭБ животных, «склеивать» ЭБ, используемые для иммунизации. Через 8 сут после иммунизации (7–10 сут — пик выработки антител) у опытных и контрольных животных отбирали пробы крови, готовили сыворотку и тестировали ее в реакции гемагглютинации, используя 1,5%-ную взвесь ЭБ.

При исследовании сывороток крови контрольных животных значения титров антител установлены на уровне $7,67 \pm 0,21$ ($\log_2$) (табл. 1). Пероральное однократное введение испытуемого препарата в терапевтической и десятикратно увеличенной дозах привело к незначительному снижению титра агглютининов в сыворотке крови животных, и они составили соответственно $6,50 \pm 0,22$; $6,17 \pm 0,47$ ($\log_2$). Введение базового препарата в десятикратной дозе не привело к достоверному изменению титров агглютининов в сыворотке и составило $7,75 \pm 0,25$ ($\log_2$). При этом все индексы реакции — 0,85; 0,80 и 1,01 укладывались в рамки оценки препарата, как не оказывающего отрицательного воздействия на выработку агглютининов.

Изучение действия лекарственных препаратов на клеточное звено иммунного ответа предполагает использование модельных систем, дающих представление о функциональной активности лимфоцитов Т-ряда. К таким тестам и относится реакция ГЗТ. Сенсибилизация организма белковыми антигенами ЭБ вызывает образование антигенспецифических Т-лимфоцитов. При повторном введении ЭБ (разрешающее введение) на месте введения развивается воспалительная реакция, интенсивность которой можно оценить [2].

Результаты исследования по изучению влияния испытуемого препарата на индукцию ГЗТ приведены в таблице 2.

Как видно из результатов исследования СМФ, введенный мышам перорально однократно в терапевтической (20 мг/кг) и десятикратно увеличенной дозах (200 мг/кг) не оказывал влияния на клеточное звено иммунитета, сдвиги индекса реакции воспаления у животных составили соответственно $9,05 \pm 3,47$ и $10,05 \pm 2,25\%$, т. е. интенсивность воспалительной реакции была на уровне контрольной группы или незначительно выше.

Базовый препарат в десятикратной дозе оказывал стимулирующее действие на процесс образования Т-лимфоцитов, что проявилось увеличением индекса воспаления $21,06 \pm 3,32\%$ по сравнению с контрольной группой $9,27 \pm 3,91\%$.

Таблица 1

Влияние препарата СМФ на антителопродукцию у мышей

Группа	Доза препарата, мг/кг	Кратность введения	Титр антител ($\log_2$)	Индекс реакции
1	20	Однократно	$6,50 \pm 0,22$	0,85
2	200	Однократно	$6,17 \pm 0,47$	0,80
3	20	Однократно	$7,75 \pm 0,25$	1,01
Контроль	–	–	$7,67 \pm 0,21$	–

$P \leq 0,05$.

Таблица 2

Реакция гиперчувствительности замедленного типа у мышей при введении препарата СМФ

Группа	Доза препарата, мг/кг	Кратность введения	ИВ, %
1	20	Однократно	$9,05 \pm 3,47$
2	200	Однократно	$10,05 \pm 2,25$
3	20	Однократно	$21,06 \pm 3,32^*$
Контроль	–	–	$9,27 \pm 3,91$

* $P \geq 0,05$.

Заключение

Таким образом, однократное введение супрамолекулярного комплекса фенбендазола в терапевтической и десятикратно увеличенной дозах не оказывает угнетающего влияния на антителогенез. Индекс действия препарата составил 0,85 и 0,80, что оценивается как отсутствие отрицательного влияния на гуморальный иммунный ответ. Статистически значимой разницы между результатами оценки влияния испытуемого препарата СМФ на клеточный иммунитет между опытными и контрольными животными также не установлено.

По результатам проведенных исследований можно говорить об отсутствии у супрамолекулярного комплекса фенбендазола иммуноотоксичности в диапазоне испытанных доз и кратности введения.

Литература

1. Варламова А. И., Архипов И. А., Данилевская Н. В., Скира В. Н. Острая токсичность супрамолекулярных комплексов фенбендазола, полученных по механохимической технологии с использованием адресной доставки Drug Delivery System // Рос. паразитол. Журнал. 2015. Вып. 2. С. 92–96.
2. Иванова А. С., Мастерняк Т. Б., Мартынов А. И. Принципы изучения иммуноотоксического действия фармакологических препаратов // Токсикологический вестник. 2010. № 5 (104). С. 26–31.
3. Колесникова О. П., Смирнов П. И. Испытание иммуноактивных свойств цидектина, аверсектина и ивомека на интактных мышах *in vitro* и в культуре *in vitro* // Вестник Новосибирского ГАУ. 2009. № 10. С. 31–34.
4. Малахова Е. И., Фролова Н. П. Влияние фенасала и ацемидофена на клеточный и гуморальный иммунитет в эксперименте // Матер. науч. конф. Всес. о-ва гельминтол. М., 1980. Вып. 32. С. 59.
5. Мамыкова О. И. Оценка иммунобиологического статуса животных после дегельминтизации и пути его коррекции: автореф. дис. ... канд. вет. наук. М.: ВИГИС, 1989. 21 с.
6. Пономарь С. И. Влияние антигельминтиков в терапевтических дозах на иммунобиологическую реактивность поросят при нематодозах // Бюлл. ВИГИС. 1990. Вып. 43. С. 31–34.
7. Ройт И. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991. С. 281–285.
8. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005. С. 501–514.
9. Arkhipov I. A., Khalikov S. S., Sadov K. M., Dushkin A. V., Meteleva E. S., Varlamova A. I., Odovskaya I. M., Danilevskaya N. V. Influence of mechanochemical technology on anthelmintic efficacy of the supramolecular complex of fenbendazole with polyvinylpyrrolidone. J. Adv. Vet. Anim. Res. 2019. 6(1): 133–141.
10. Le Garrec D., Gori S., Luo L. et al. Poly(N-vinylpyrrolidone)-blockpoly (D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: *in vitro* and *in vivo* evaluation. J. Control Release. 2004. 99: 83–101. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.018>
11. Lukyanov A. N., Torchilin V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. Advanced Drug Delivery Reviews. 56, (9):1273–1289.
12. Rogero S. O., Malmonge S. M., Lugao A. B. et al. Biocompatibility study of polymeric biomaterials. Artif. Organs. 2003; 27: 424–427.

References

1. Varlamova A. I., Arkhipov I. A., Danilevskaya N. V., Skira V. N. Acute toxicity of supramolecular fenbendazole complexes obtained by mechanochemical technology using targeted delivery of the Drug Delivery System. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2015; 2: 92–96. (In Russ.)
2. Ivanova A. S., Masternak T. B., Martynov A. I. Principles of studying the immunotoxic effect of pharmacological preparations. *Toxicological Bulletin*. 2010; 5 (104): 26–31. (In Russ.)
3. Kolesnikova O. P., Smirnov P. I. Test of immunoactive properties of cidectin, aversectin and ivomek on intact mice *in vitro* and *in vitro* culture. *Bulletin of the Novosibirsk State Agrarian University*. 2009; 10: 31–34. (In Russ.)
4. Malakhova E. I., Frolova N. P. Influence of fenasal and acemidofen on cellular and humoral immunity in the experiment: Materials of reports of the scientific conference of the All-Russian Society of Helminthologists of the Russian Academy of Sciences "Theory and Practice of Fighting Parasitic Diseases". М., 1980; 32: 59. (In Russ.)
5. Mamykova O. I. Evaluation of the immunobiological status of animals after deworming and the ways of its correction: avtoref. dis. ... Phd. М., 1989; 21. (In Russ.)

6. Ponomar S. I. Effect of anthelmintics in therapeutic doses on immunobiological reactivity of piglets at nematodosis. *Bull. VIGIS*. 1990; 43: 31–34. (In Russ.)
7. Roit I. Basics of Immunology. M.: Mir, 1991; 281–285. (In Russ.)
8. Khabriev R. U. Guidelines for Experimental (Non-Clinical) Study of New Pharmaceutical Ingredients. M., 2005; 832. (In Russ.)
9. Arkhipov I. A., Khalikov S. S., Sadov K. M., Dushkin A. V., Meteleva E. S., Varlamova A. I., Odoevskaya I. M., Danilevskaya N. V. Influence of mechanochemical technology of the supramolecular complex of fenbendazole with polyvinylpyrrolidone. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 2019; 6 (1): 133–141.
10. Le Garrec D., Gori S., Luo L. et al. Poly (N-vinylpyrrolidone) -blockpoly (D, L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: in vitro and in vivo evaluation. *J. Control Release*. 2004. 99: 83–101.
11. Lukyanov A. N., Torchilin V. P. Water-soluble polymers Micelles from lipid. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56, (9): 1273–1289.
12. Rogero S. O., Malmonge S. M., Lugao A. B. et al. Biocompatibility study of polymeric biomaterials. *Artif. Organs*. 2003; 27: 424–427.