

Ветеринария

УДК 619:616.995.1-085

DOI:10.31857/S2500-2627-2020-1-50-53

УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПРИ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ СТРОНГИЛЯТОЗОВ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

О.И. Мамыкова, кандидат ветеринарных наук

*Всероссийский институт фундаментальной и прикладной паразитологии –
филиал ФНЦ ВИЭВ РАН,
117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28
E-mail: olga.mamykova@yandex.ru*

Изучены некоторые параметры иммунного статуса животных при комбинированной и традиционной терапии. Выявлены положительная динамика циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в кровотоке и восстановление состава клеток белой крови после комбинированной терапии ягнят со спонтанной инвазией стронгилятами желудочно-кишечного тракта. Предварительные подкожные двукратные инъекции риботана в дозе 0,05 мл/кг и пероральное введение фенбендазола в терапевтической дозе 5 мг/кг вызывают достоверное снижение ЦИК в кровотоке животных ($74,3 \pm 3,49$ ед.опт.пл. E_{450} ; $p < 0,05$) и предупреждают развитие функциональных расстройств кроветворения, восстанавливая состав клеток белой крови – лимфоцитов и эозинофилов – до исходного уровня в ранние сроки после назначения препаратов. Исследования показали, что ремиссия ЦИК и восстановление кроветворения являются отражением эффективности лечения и завершения патологического процесса. Обсуждаются возможные механизмы клиренса иммунных комплексов в циркуляции и причины восстановления состава клеток белой крови после комбинированного лечения.

LEVEL OF CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES AND HEMATOLOGICAL PROFILE AT COMBINATION TREATMENT OF GASTROINTESTINAL STRONGYLATA INFECTION

Мамыкова О.И.

*The All- Russian Institute of Fundamental and Applied Parasitology –
FSC RIEV RAS,
117218, Moskva, ul. B. Cheremushkinskaya, 28
E-mail: olga.mamykova@yandex.ru*

Some parameter of animal immune status at combination and traditional methods therapy were studied. Positive dynamics of circulating immune complexes (CIC) and restoration white blood cells composition at combination therapy ship infected with gastrointestinal strongylata was found. Preliminary twice subcutaneous injections of ribotane at dose level of 0,05 ml/kg of body weight and fenbendazole given once perorally at therapeutic dose level of 5 mg/kg of body weight resulted in remission of circulating immune complexes in animal blood flow ($74,3 \pm 3,49$ un.opt.dens. E_{450} ; $p < 0,05$) and prevented the development of function disorder of blood formation restoring the composition of white blood cells – lymphocytes, eosinophils – to initial level in the early period after drugs administration. These results demonstrated that CIC's remission and restoring blood formation are reflection of the effectiveness of treatment and completion of the pathological process. The possible mechanisms of immune complexes clearance in the circulation and the reasons for restoration the composition of white blood cells after combination treatment were discussed.

Ключевые слова: циркулирующие иммунные комплексы, лимфоцит, эозинофил, иммуномодулятор риботан, фенбендазол, иммунный ответ, комплексная терапия гельминтозов

Key words: circulating immune complexes, lymphocyte, eosinophil, immunomodulator ribotane, fenbendazole, immune response, complex therapy of helminthoses

Оценка антигельминтной эффективности комбинации фенбендазола и нилверма с иммуномодулятором риботаном на лабораторной модели мышь (*Aspicularis tetraptera*) и ягнятах со спонтанной инвазией стронгилятами желудочно-кишечного тракта выявила усиление основного эффекта антигельминтных препаратов, а также неспецифической резистентности к гельминтам [1]. Эффективность лечения и устойчивость к гельминтам находились в обратной зависимости от дозы иммуномодулятора. Риботан в оптимальной дозе, как биологически активное вещество, индуцировал потенцирование основного эффекта фенбендазола. Использование иммуномодулятора не только повышало эффективность лечения, позволяя снизить дозу фенбендазола, необходимую для достижения более высокого лечебного эффекта, но и индуцировало устойчивость

к повторному заражению. Очевидно, что применение дополнительного лекарственного препарата обеспечивает изменение выраженности основного эффекта фенбендазола и, соответственно, более эффективную элиминацию гельминтов из организма хозяина, вовлекая иммунологические механизмы выздоровления. Персистенция циркулирующих иммунных комплексов является одним из главных механизмов в развитии иммунопатологических изменений при гельминтозах. Кроме того, разнообразие и гиперпродукция антител имеют значение в формировании функциональных расстройств кроветворения, которые, как отмечала Шуйкина Э.Е. [2], являются логическим завершением патологии иммунной системы. Автор теоретически допускает общность в регуляции кроветворения и иммунного ответа. Наблюдения за динамикой гематоло-

гических показателей после терапии гельминтозов в литературе немногочисленны и не имеют достаточной клинической направленности.

В связи с этим представляет интерес изучение динамики уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и состава периферической крови, как показателя патологии иммунной системы, на фоне терапевтического вмешательства.

Методика. Работа проведена на базе экспериментального хозяйства ВНИИ гельминтологии им. К.И. Скрябина «Курилово». Под наблюдением находились 18 ягнят со спонтанной инвазией стронгилятами желудочно-кишечного тракта. Интенсивность инвазии варьировалась в пределах $187,9 \pm 76,71 - 331,9 \pm 230,9$ яиц стронгилят в 1 г фекалий. В работе применяли риботан – комплексный иммуномодулятор, состоящий из смеси низкомолекулярных (0,5-1,0 кД) полипептидов и низкомолекулярных фрагментов РНК. Согласно инструкции по применению, препарат стимулирует иммунологическую реактивность, функциональную активность макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, а также синтез интерферона и лимфокинов. По нашим данным, риботан обладает биорегуляторной активностью, оказывая влияние на функциональное состояние монооксигеназной системы печени [3]. Риботан применяли в дозе 0,05 мл/кг двукратно подкожно с интервалом 48 часов. В качестве антигельминтного средства использовали фенбендазол (5-фенил-тио-2-бензимидазол карбамат). Терапевтическая доза фенбендазола составила 5 мг/кг. Препарат вводили однократно перорально.

Для проведения исследований были сформированы 4 группы животных. Ягнятам I группы применяли фенбендазол. II группа животных получала подкожные инъекции иммуномодулятора риботана. III группа подвергалась комбинированной терапии, которая включала последовательное применение риботана и фенбендазола, введенного одновременно с заключительной инъекцией иммуномодулятора. В IV (контрольную) группу вошли зараженные животные, не получавшие лекарственных препаратов. Объектом исследований служили цельная кровь и ее сыворотка. Венепункцию проводили до терапевтического вмешательства, и на 1-й и 9-й день после заключительного введения препаратов.

Количественный анализ циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови определяли методом, основанном на селективной преципитации ком-

плексов антиген-антитело (АНГ-АНТ) в 3,75%-ном растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000) на 0,1 М боратном буфере (рН=8,4) с последующим определением плотности преципитата. Оптическую плотность преципитата определяли на спектрофотометре Spekoll-11 при 450 нм (E_{450}). Результат выражали в единицах оптической плотности [4].

Для дифференцирования клеток белой крови использовали комбинированное окрашивание красителем Май-Грюнвальда и свежеприготовленным раствором краски Романовского. Лейкоциты подсчитывали в счетной камере Горяева, затем используя общепринятую формулу подсчета.

Результаты исследования обработаны методом математической статистики. Достоверность различий между средними величинами определяли с помощью t критерия Стьюдента при уровне значимости $p=0,05$.

Результаты и обсуждение. Контроль концентрации иммунных комплексов в сыворотке крови представляет наибольший интерес. Известно, что гельминты активно воздействуют на иммунную систему, изменяя иммунный ответ. Сложный антигенный состав гельминтов, гиперпродукция антител индуцируют образование и персистенцию комплексов АНГ-АНТ в циркуляторном русле. Присутствие в кровотоке иммунных комплексов оказывает ингибирующее воздействие на функциональную активность Т- и В-лимфоцитов, и, соответственно, их иммунологическую компетенцию. Это обусловлено взаимодействием специфических IgG – антител с FC–рецепторами лимфоцитов с последующим функциональным выключением клетки, подавлением пролиферативной или иной активности. Клетками-мишенями для такого взаимодействия, как правило, являются В-лимфоциты [5, 6].

При количественном анализе ЦИК в сыворотке крови ягнят обнаружен высокий уровень комплексов АНГ-АНТ, превышающий 100,0 опт.ед. (E_{450}). Высокий уровень ЦИК в кровотоке является проявлением иммунокомплексного процесса, который обусловлен нарушением равновесия между образованием и элиминацией ЦИК и ослаблением клиренса иммунных комплексов АНГ-АНТ. Для иммунокомплексного процесса характерен дефект В-лимфоцитов, ослабление образования интерлейкина 2 (IL2), необходимого для нормальной генерации супрессорных Т-лимфоцитов [7]. Повышение содержания комплексов АНГ-АНТ после химиотерапии мы расцениваем как результат

Уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови овец на фоне терапии стронгилятозов желудочно-кишечного тракта (ед.опт.пл. E_{450})

Группа	Препарат	Доза	Кратность введения	Срок наблюдения		
				фон	1 сут	9 сут
I	фенбендазол	5,0 мг/кг	однократно	101,3±12,5	116,0±11,4*	110,0±5,53
II	риботан	0,05 мл/кг	двукратно	124,7±13,8	102,0±20,3	118,0±26,9
III	риботан + фенбендазол	0,05 мл/кг 5,0 мг/кг	двукратно однократно	110,3±6,4	74,3±3,5*	80,0±7,4
IV (контрольная)	-	-	-	90,3±15,9	93,7±4,5	85,7±13,1

* $p < 0,05$

сенсibilизации организма хозяина поверхностными и метаболитическими антигенами, высвобождающимися вследствие гибели гельминтов, и кратковременной стимуляцией В-лимфоцитов в течение первых 3-х суток после введения антигельминтного препарата.

Результаты количественного анализа ЦИК в сыворотке крови представлены в таблице. В кровотоке зараженных животных контрольной группы выявлена персистенция высоких концентраций ЦИК со средними значениями $85,67 \pm 13,1 - 93,7 \pm 4,5$ ед. опт. пл. (E_{450}) на протяжении всего периода наблюдений. Фенбендазол в терапевтической дозе 5,0 мг/кг вызывал повышение концентрации ЦИК в кровотоке. Через сутки после применения препарата концентрация ЦИК превосходила на 15% исходный уровень и статистически достоверно превышала средние значения у животных контрольной группы. К концу срока наблюдений персистенция ЦИК сохранялась, что указывает на сенсibilизацию организма животных антигенами гельминтов и подавление функциональной активности систем организма, ответственных за клиренс иммунных комплексов после терапии.

Кратковременная ремиссия ЦИК выявлена после подкожных инъекций риботана. Концентрация иммунных комплексов снизилась на 18,1% относительно исходного уровня. К концу срока наблюдений отмечено повышение уровня ЦИК, который приближался к исходным значениям. Полагаем, что кратковременная ремиссия ЦИК обусловлена иммуностимулирующими свойствами риботана как иммуностимулятора короткого и быстрого действия. Двукратное введение препарата не обеспечивало поддержания его постоянной концентрации в крови и тканях организма животных. С другой стороны, увеличение кратности введения может спровоцировать изменение направленности иммунобиологического действия риботана в сторону реакций гуморального типа, что может обострить течение инвазии и снизить эффективность терапии.

Включение риботана в терапию гельминтозов обеспечивало стойкую ремиссию ЦИК в кровотоке животных. Эффект снижения концентрации ЦИК статистически достоверен. Снижение концентрации иммунных комплексов в кровотоке указывает на нормализацию их клиренса и восстановление функционирования систем организма, ответственных за равновесие процессов образования и элиминации комплексов АНГ-АНТ. Несомненно, что ремиссия ЦИК обусловлена также восстановлением Т-супрессорных клеток и их регуляторным воздействием на пролиферацию В-лимфоцитов в плазматические клетки, что приводит к снижению антителопродукции. Ремиссия ЦИК указывает на более эффективную элиминацию гельминтов, предотвращение развития сенсibilизации организма хозяина соматическими и метаболитическими антигенами паразитов вследствие снижения антигенного материала и, соответственно, устранения разнообразных патологических процессов, которые могут иметь место в условиях персистенции высоких концентраций ЦИК в кровотоке. Значительное снижение уровня ЦИК в сыворотке крови после излечения от инвазии связывают с нормализацией иммунного статуса [8]. Кроме того, наши исследования показали, что ремиссия ЦИК является отражением эффективности лечения.

Определение относительного и абсолютного уровня клеток белой крови позволяет оценить иммунологический потенциал организма в целом. Гельминтозы относятся к заболеваниям, сопровождающимся

расстройством кроветворения. Токсины гельминтов, как факторы патогенности, наряду с разнообразными изменениями в организме, способны активно воздействовать на кроветворение и вызывать гибель лейкоцитов, в том числе и лимфоцитов. Направленное воздействие на кроветворение оказывает *Schistosoma mansoni*. При экспериментальном шистосомозе формируются экстрамедуллярные очаги кроветворения с дифференцировкой в эозинофилы. Интенсивная эозинофилия является общим признаком гельминтозов и, как правило, ассоциируется с миграцией паразитов в организме хозяина [2, 9].

При гематологическом исследовании животных, леченных фенбендазолом, изменений уровня лейкоцитов не обнаружено. Содержание лейкоцитов в периферической крови колебалось в пределах $9,48 \pm 1,11 - 10,03 \pm 1,17 \times 10^9$ клеток/л. Однако через сутки после применения антигельминтика выявлена относительная и абсолютная лимфопения, что косвенно указывает на угнетение кроветворных органов и снижение количества иммунокомпетентных клеток. Относительный и абсолютный уровень лимфоцитов составил $37,6 \pm 7,13\%$ или $3,68 \pm 0,39 \times 10^9$ клеток/л. К концу срока наблюдений отмечена тенденция к нормализации содержания лимфоцитов и значительное снижение эозинофилов в периферической крови до $3,0 \pm 0,7\%$ или $0,29 \pm 0,09 \times 10^9$ клеток/л.

Введение риботана не сопровождалось заметным сдвигом в лейкоцитарном профиле животных. Отмечено снижение эозинофилов среди клеток белой крови до $3,0 \pm 1,41\%$ или $0,4 \pm 0,11 \times 10^9$ клеток/л на 9-е сутки после применения иммуностимулятора. Зарегистрировано также повышение содержания лейкоцитов за счет возрастания абсолютного уровня лимфоцитов на 23,6% ($6,02 \pm 3,81 \times 10^9$ клеток/л) относительно исходных значений ($4,87 \pm 1,03 \times 10^9$ клеток/л) к концу срока наблюдений.

У животных, получивших комбинированную терапию, через сутки после ее окончания выявлено незначительное снижение (на 27%) содержания лимфоцитов до $41,6 \pm 6,88\%$ или $4,45 \pm 0,91 \times 10^9$ клеток/л на фоне снижения общего числа лейкоцитов ($10,61 \pm 0,5 \times 10^9$ клеток/л). На 9-е сутки наблюдений число лимфоцитов восстанавливалось до исходного уровня. Наряду с лейкопенией выявлен подъем эозинофилов среди клеток белой крови до $7,66 \pm 1,47\%$ или $0,94 \pm 0,2 \times 10^9$ клеток/л. Увеличение содержания эозинофилов является благоприятным прогностическим признаком и свидетельствует о повышении сопротивляемости организма. Повреждение и гибель паразитов многие авторы связывают с эозинофилией. Выявлена прямая корреляционная связь между эозинофилией и резистентностью к паразитам после терапии. Повышение уровня эозинофилов среди клеток белой крови ассоциируется с индукцией IL5 [10-12].

Подавление эозинофильной реакции и адгезивной способности эозинофилов и нейтрофилов связывают с тяжестью течения инвазии и снижением эффективности лечения. Механизмы гибели и изгнания паразитов индуцируются специфическими антителами совместно с эффекторными клетками, лейкоцитами, моноцитами и эозинофилами, активированными иммунорегуляторными цитокинами IL2, IL-3, 4, 5, TGF- β [13, 14].

К настоящему времени доказано, что терапия гельминтозов должна включать средства воздействия на клеточное звено иммунитета, что обусловлено преобладанием иммунных реакций гуморального типа (Th2)

[15]. Повышение устойчивости животных к инвазии под влиянием риботана сопряжено с усилением функциональной активности Т-лимфоцитов и их регуляторным воздействием на В-лимфоциты. К настоящему времени идентифицированы функциональные различия клеток Т-лимфоцитарного ряда. Функциональная активность клона Th1 хелперных клеток с фенотипом CD⁴ ассоциирована с резистентностью к гельминтам. Гибель и изгнание паразитов из организма хозяина коррелирует с уровнем IFN γ и подавлением продукции IL4 (цитокина Th2 клеток) [16, 12, 17]. IL2 и IFN γ , синтезируемые CD⁴ клетками, вызывают пролиферацию и активизацию супрессорных клеток с фенотипом CD⁸, которые участвуют в дополнительной экспрессии IFN γ в присутствии CTLs [13, 18]. Т-супрессорные клетки играют ведущую роль в регуляции иммунологической реактивности как индукторы продукции IFN γ – универсального фактора защиты. IFN γ и цитокины Th1 клона CD⁴ клеток совместно со специфическими антителами индуцируют механизмы гибели и изгнания паразитов из организма хозяина [14]. В наших экспериментах на усиление супрессорных влияний указывает ремиссия ЦИК в кровотоке – важного патогенетического фактора в развитии нарушений иммунного статуса при инвазионной патологии и терапии гельминтозов. Развитие иммунологических механизмов выздоровления и протективных иммунных реакций при гельминтозах связано со способностью Т-лимфоцитов к продукции IFN γ .

С учетом концепции об ингибирующем действии ЦИК на активность иммунокомпетентных клеток и их функциональном выключении [6] полагаем, что развитие протективных механизмов обусловлено эффектом нарастания популяции Т-лимфоцитов вследствие устранения блокады Fc-рецепторов клеток иммуноглобулиновыми молекулами. Восстановление иммунологической компетенции клеток является следствием снижения продукции антител различной специфичности в результате более эффективной элиминации гельминтов, что, в свою очередь, предотвращает сенсибилизацию организма хозяина соматическими и метаболическими антигенами гельминтов.

Положительная динамика уровня иммунных комплексов в циркуляции, восстановление кроветворения позволяют говорить о предпочтительности комбинированной терапии по сравнению с традиционными методами лечения гельминтозов. Исследования показывают, что действие дополнительных средств терапии должно быть направлено на подавление иммунных реакций Th2 типа, что обеспечит десенсибилизацию организма хозяина антигенами паразита и определит высокую эффективность терапевтического вмешательства. Сопоставив результаты терапевтических и иммунологических экспериментов по изучению возможности применения риботана в терапии гельминтозов, заключаем, что ремиссия циркулирующих иммунных комплексов и восстановление кроветворения являются отражением эффективности лечения и указывают на завершение патологического процесса.

Литература

1. Мамыкова О.И. Терапевтические эффекты антигельминтных препаратов на фоне иммуномодуляции риботаном // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2014. – № 3. – С. 52-55.
2. Шуйкина Э.Е. Патология иммунной системы при инфекционных болезнях / В кн. Итоги науки и техники. Серия Иммунология. – М.: 1979. – Т.8. Патология иммунной системы. – С. 70-91.
3. Мамыкова О.И. Иммунорегуляторная активность стимулятора неспецифической резистентности риботана и его ингибирующее действие на систему цитохрома P-450 печени мышей, инвазированных *A. tetraptera* // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009. – № 5. – С. 51-54.
4. Гриневиц Ю.А., Алфёров А.И. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лабораторное дело. – 1981. – № 8. – С. 493-495.
5. Ryan J.L., Henkart P.A. Inhibition of B lymphocyte activation by interaction with Fc receptors // Immunol. Commun. – 1976. – V. 5. – N 5. – P. 455-468.
6. Кульберг А.Я. Роль комплексов антиген-антитело в подавлении активности лимфоцитов и супрессии иммунного ответа // Иммунология. – 1982. – № 4. – С. 12-19.
7. Насонов Е.Л., Сура В.В. Взаимосвязь аутоиммунной и иммунокомплексной патологии: современное состояние проблемы // Терапевтический архив. – 1984. – Т. LVІ. – № 10. – С. 4-10.
8. Cuellar C., Fenoy S., Aguila C. Evaluation of chemotherapy in experimental toxocarosis by determination of specific immune complexes // J. Helminthol. – 1990. – V. 64. – N 4. – P. 279-289.
9. Andrade R.S., Andrade A.S., Suarez J.L. Relationship among presence of antibodies against *Ascaris suum* eosinophilia and autoantibodies (igm-rf) // Intern J. Appl. Res. Vet. Med. – 2009. – V.7. – N 1. – P. 57-62.
10. Meeusen E.N.T., Balic A. Do eosinophils have a role in the killing helminth parasites? // Parasitology Today. – 2000. – V. 16. – I. 3. – P. 95-107.
11. Klion A.D., Nutman T.B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites // J. of Allergy and Clinical Immunol. – 2004. – V. 113. – I. 1. – P. 30-37.
12. Fabre V., Beiting D.P., Bliss S.K., Gebreselassie N.G. Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection // J. Immunol. – 2009. – V. 182. – I. 3. – P. 1577-1583.
13. Meeusen E.N.T. Immunology of helminth infection with special reference to immunopathology // Vet. Parasitol. – 1999. – V. 84. – P. 259-273.
14. Meeusen E.N.T., Balic A., Bowles V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasite // Vet. Immunol. and Immunopathol. – 2005. – V. 108. – I. 1-2. – P. 121-125.
15. Мамыкова О.И. Иммуномодулирующая активность Т-активина при назначении с фенбендазолом в различных режимах // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2008. – № 3. – С. 52-55.
16. Pena M.T. Miller J.E., Horochov D.W. Effect of CD+4 T lymphocyte depletion on resistance of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection // Vet. Parasitol. – 2006. – V. 138. – I. 3-4. – P. 240-246.
17. Pleass, R.J., Behnke J.M. B-cells get the T-cells but antibodies get the worms // Trends in Parasitol. – 2009. – V. 25. – I. 10. – P. 443-446.
18. Mealey R.H., Long M.T. Mechanisms of disease and immunity // Equine Internal Medicine (Fourth Edition). – 2018. – Chap. 1. – P. 3-78.

Поступила в редакцию 03.07.19

После доработки 20.08.19

Принята к публикации 21.09.19