

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ АЛБЕНДАЗОЛА В НИЗКИХ ДОЗАХ

О.И. Мамыкова, кандидат ветеринарных наук

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

Оценка иммунотропной активности албендазола в низких терапевтических дозах проведена на основе тестирования способности организма мышей линии CBA×C57BL/6 к индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и синтеза антител против тимусзависимого антигена. Показано, что албендазол в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг не оказывал действия на иммунный ответ клеточного и гуморального типа. Индексы ГЗТ составили 10,1±3,14 и 10,8±2,45%, соответственно, и незначительно превосходили таковые в контроле на 3,1 и 10,2%. При введении албендазола в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг иммунизированным животным, log_{1/2} титра гемагглютининов крови составил 6,8±0,46 и 7,0±0,47, а индексы действия албендазола – 1,03 и 1,06. Титр гемагглютининов в крови экспериментальных животных превышал таковой в контроле на 3,0 и 6,1%, соответственно. Показано, что иммунокомпетентные клетки, функционально обеспечивающие формирование замедленной гиперчувствительности и синтез антител против тимусзависимого антигена, толерантны к албендазолу. Албендазол в низких терапевтических дозах 2,5 и 5,0 мг/кг при однократном введении не обладал иммунотропной активностью. В испытанных дозах албендазол не является регулятором клеточных и гуморальных процессов, так как не способствует модуляции функциональной активности иммунокомпетентных клеток и их кооперативного взаимодействия, необходимых для развития иммунного ответа клеточного и гуморального типа.

EXPERIMENTAL STUDY OF ALBENDAZOLE IMMUNOTROPIC ACTIVITY IN LOW DOSES

Mamykova O.I.

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

The immunotropic activity of albendazole in low doses was evaluated based on testing the ability of organism of CBA×C57BL/6 line mice to induce a delayed type hypersensitivity reaction (DTH) and the synthesis of antibodies to a thymus-dependent antigen. It was shown that albendazole at dose levels of 2,5 and 5,0 mg/kg of body weight had no effect on the immune response of the cellular and humoral type. DTH index amounted to 10,1±3,14 and 10,8±2,45%, respectively, and slightly exceeded that in the control by 3,1 and 10,2%. After the introduction with albendazole at the dose levels of 2,5 and 5,0 mg/kg of body weight to immunized animals, the logarithm of the antibody titer was 6,8±0,46 and 7,0±0,47, and drug action indexes were 1,03 and 1,06. The hemagglutinin titer in the blood of experimental animals exceeded that in the control by 3,03 and 6,1%, respectively. It was shown that immunocompetent cells that functionally provide the formation of delayed hypersensitivity and the antibodies synthesis against thymus-dependent antigen are tolerant to albendazole. Albendazole at low therapeutic dose levels of 2, 5 and 5, 0 mg/kg of body weight did not possess immunotropic activity. In the tested doses, albendazole is not a regulator of cellular and humoral processes, since it does not contribute to the modulation of the functional activity of immunocompetent cells and their cooperative interaction necessary for the development of cellular and humoral type immune response.

Ключевые слова: иммунотропная активность, албендазол, гиперчувствительность замедленного типа, гемагглютинины, синтез антител, клеточный и гуморальный иммунный ответ

Key words: immunotropic activity, albendazole, delayed type hypersensitivity, hemagglutinin, synthesis of antibodies, cellular and humoral type immune response

Накопленные данные о нежелательных побочных эффектах лекарственных препаратов на иммунную систему привели к формированию научного направления – иммунофармакологии, которое включает оценку механизма иммунотоксического или иммунотропного действия потенциальных лекарственных препаратов на основные иммунокомпетентные клетки [1]. Механизм иммунотропного действия дает представление о способе взаимодействия лекарственных препаратов с иммунокомпетентными клетками, при котором наблюдается определенная картина, характерная для конкретного лекарственного средства. Антигельминтики относятся к фармакологическим препаратам, которые применяют однократно или короткими неповторяющимися курсами, поэтому необходимость изучения их иммунотропной активности рассматривается индивидуально. Оценка иммунотропного действия может быть продиктована отсутствием обоснованных экспериментальных данных об отрицательных эффектах медикаментов, близких по действию и химической струк-

туре, а также их аналогов. Изучение иммунотропной активности антигельминтиков предпринимается нами в связи с особенностями иммунного ответа при гельминтозах, ассоциированного с дисбалансом клеточных и гуморальных факторов [2, 3, 4], и обнаружением отрицательной динамики параметров иммунного статуса у экспериментальных животных после проведенной терапии [5]. Знание механизма действия лекарственных веществ является необходимым условием для разработки способов и поиска средств целенаправленной коррекции действия медикаментов для устранения или ослабления нежелательных побочных эффектов с помощью активных регуляторов иммунного ответа. В связи с этим целью настоящих исследований явилась оценка иммунотропных эффектов антигельминтного препарата албендазола из группы производных карбаматбензимидазола, нашедших широкое применение в практике терапии гельминтозов [6, 7, 8].

Методика. Оценка иммунотропных эффектов албендазола проведена в двух опытах на 60 самцах мышей

линии СВА×С57ВL/6. Албендазол – антигельминтное средство, производное карбаматбензимидазола [5-(пропилтио)-1-Н-бензимидазол-2-ил] карбамиловой кислоты метиловый эфир. Брутто формула $C_{12}H_{15}N_3O_2S$. Нематодоцидная активность албендазола обусловлена избирательным подавлением полимеризации β -тубулина, нарушением всасывания глюкозы и синтеза АТФ [9, 10]. Албендазол эффективен в широком диапазоне доз, как при однократном применении, так и при назначении по курсовой схеме. Препарат эффективен в отношении гельминтов: нематод (*Trichinella spiralis*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*), цестод (*Hemenolepis nana*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*), трематод (*Opisthorchis viverrini*). Эффективность албендазола доказана при тканевых паразитах – гидатидозах (*Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*) и цистицеркозах (*Cysticercus cellulosus*).

При тестировании иммуотропного действия албендазола на клеточный иммунитет (Th1) применяли модель гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), которую воспроизводили по методу Kitamura [11]. Формирование клеточной реакции ГЗТ дает представление о способности фармакологических препаратов или биологически активных веществ влиять на интенсивность продукции сенсibilизированными лимфоцитами медиаторов клеточного иммунитета разнонаправленного действия в присутствии макрофагов при повторной встрече с соответствующим антигеном. Продукцию медиаторов клеточного иммунитета клетками-эффекторами ГЗТ стимулировали тимусзависимым антигеном – нативными эритроцитами барана (ЭБ).

Изучение иммуотропного действия албендазола на клеточный иммунитет проведено на 30 мышах, разделенных на 3 группы. Для воспроизведения реакции ГЗТ мышей подопытных групп иммунизировали однократно интраперитонеально сенсibilизирующей дозой тимусзависимого антигена: 0,5 мл 3%-ной суспензии ЭБ в стерильном физиологическом растворе. Албендазол вводили в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг однократно перорально с помощью пищеводного зонда после сенсibilизирующей инъекции тимусзависимого антигена. Контролем служили животные, которым вводили только разрешающую дозу антигена.

Для выявления сенсibilизации на пятые сутки осуществляли локальный перенос антигена (разрешающая инъекция) в подушечку правой задней лапы мышей. В контрлатеральную лапу вводили физиологический раствор. О степени выраженности воспалительной реакции судили по приросту массы лап через 24 часа после разрешающей инъекции антигена. По разнице массы опытной и контрольной лап вычисляли индекс реакции ГЗТ (ИР) для каждой мыши по формуле:

$$ИР = (M_o - M_k) / M_k \times 100\%,$$

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

Т-клеточно-опосредованный гуморальный иммунный ответ (Th2) при введении албендазола оценивали на основе тестирования способности организма мышей к выработке антител (гемагглютининов) против иммунизирующего агента – неинфекционного тимусзависимого антигена (нативных эритроцитов барана). Для индукции продукции гемагглютининов всех мышей иммунизировали интраперитонеально оптимальной дозой тест-антигена – 0,5 мл 3%-ной суспензии ЭБ трижды отмытых в стерильном физиологическом

растворе. Албендазол в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг вводили в индуктивную фазу иммунного ответа. Титр антител в сыворотке крови каждой мыши определяли на пике первичного иммунного ответа в микроварианте прямой реакции гемагглютинации (РГА) [12]. РГА основана на адгезии частиц, несущих антиген (ЭБ), и специфических антител, содержащихся в крови. Титр антител выражали в виде $\log_{1/2}$ числа. Для сравнения выраженности иммунного ответа в опыте и в контроле определяли индекс действия препарата (ИД) [13], который представляет собой отношение титра антител в опыте к величине титра антител в контроле. Значение ИД 0,7 и $< 0,7$ свидетельствует о подавлении гуморального иммунного ответа под влиянием тестируемого препарата: значение ИД 1,3 и $> 1,3$ соответствует стимулирующему эффекту [14].

Статистическую обработку проводили с помощью программы «STUDENT 200». Достоверность разности между изучаемыми признаками определяли по критерию t Стьюдента при уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение. Использование модельной системы гиперчувствительности замедленного типа позволяет оценить функциональную активность CD^{4+} хелперных клеток Th1 клона и их способность к экспрессии провоспалительных цитокинов TNF- α , IFN- γ , IL2 и IL6 [15]. Фармакологические средства или биологически активные вещества, вызывающие сдвиг индекса реакции ГЗТ, оказывают влияние на клеточный иммунитет, индуцируя синтез сенсibilизированными лимфоцитами медиаторов клеточного иммунитета. Степень воспалительной реакции в месте локального переноса антигена соответствует интенсивности формирования клеточной реакции ГЗТ. Результаты тестирования способности организма мышей к индукции ГЗТ при введении малых доз албендазола представлены в таблице 1.

Из приведенных данных следует, что однократное применение албендазола в терапевтических дозах 2,5 и 5,0 мг/кг не вызывало существенного изменения интенсивности формирования клеточной реакции ГЗТ. Значения индексов реакции ГЗТ у экспериментальных животных, получивших албендазол, превосходили таковой у мышей контрольной группы на 3,1 и 10,2%, соответственно, и не имели статистически значимых различий ($p > 0,05$). Воспроизведение реакции гиперчувствительности замедленного типа при введении албендазола показало, что эффекторные клетки ГЗТ, выполняющие лимфокинсекреторную функцию, толерантны к албендазолу в испытанных дозах. Теоретически допустимо, что эффекторные клетки ГЗТ менее резистентны к албендазолу в дозе 5 мг/кг, поскольку индекс реакции более чем в 3 раза превышал

Табл. 1. Интенсивность формирования гиперчувствительности замедленного типа у мышей линии СВА×С57ВL/6 при введении албендазола в низких дозах

Группа	Препарат	Доза, мг/кг	Кратность введения	Индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа, %
1 опытная	албендазол	2,5	однократно	10,1±3,19
2 опытная	албендазол	5,0	однократно	10,8±2,45
3 контрольная	-	-	-	9,8±2,25

таковой при введении препарата в дозе 2,5 мг/кг. Фактически албендазол в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг не вызывал сдвига индекса реакции ГЗТ, и, следовательно, не обладал иммуотропной активностью в отношении клеточного иммунитета.

Результаты воспроизведения модельной системы замедленной гиперчувствительности на линейных мышах СВА×С57BL/6 при введении албендазола противоречат ранее полученным данным. В эксперименте на белых беспородных мышах показано, что албендазол в диапазоне доз 2,5 – 10,0 мг/кг подавлял интенсивность формирования клеточной реакции ГЗТ. Выявлена обратная зависимость эффекта подавления иммунных реакций Th1 типа от дозы албендазола [16]. В литературе также представлены противоречивые сведения о влиянии албендазола на продукцию провоспалительных цитокинов CD⁺4 хелперными клетками Th1 клона. Показано усиление продукции IFN γ и IL2 при введении албендазола в комбинации с биологически активными веществами (L-MTP-PE, TF – фактор переноса) или вакцинами (живая холерная вакцина CVD 103-HgR). Усиление иммунных реакций клеточного типа (Th1) ассоциируется с ингибированием гуморального иммунного ответа (Th2) на фоне подавления продукции IL5, а также с торможением развития инвазии при экспериментальном альвеолярном гидатидозе мышей [17, 18] и у лиц, инвазированных *Ascaris lumbricoides* [19]. Ингибирование албендазолом секреции провоспалительных медиаторов клеточного иммунитета выявлено *in vitro* в первичной культуре крысиных купферовских клеток [20]. На основании данных собственных исследований и литературных сведений полагаем, что иммуотропная активность албендазола зависит от функционального состояния иммунной системы на момент введения антигельминтного препарата.

О состоянии гуморального иммунного ответа судили по интенсивности синтеза антител против тимусзависимого антигена. Согласно принятому положению, титр антител в крови экспериментальных животных при введении фармакологических средств косвенно отражает функциональную активность и кооперативное взаимодействие основных клеток иммунной системы (Т-, В- лимфоциты и макрофаги), включая главные фазы иммунного ответа от момента поступления в организм антигена до появления в крови антител: фагоцитоз, презентация антигена, активизация, пролиферация, дифференцировка, созревание плазматических клеток и синтез специфических антител. Иммунный ответ на тимусзависимый антиген определяется Т-клетками и макрофагами и характеризует преимущественно функцию Th2 лимфоцитов, которые дифференцируются из нативных CD⁺4 клеток под влиянием IL4. Клетки Th2 экспрессируют противовоспалительные цитокины IL4, IL10, IL13, IL5 и участвуют в продукции основных классов антител [21, 15, 22].

Табл. 2. Интенсивность Т-клеточно-опосредованного гуморального иммунного ответа у мышей линии СВА×С57BL/6 при введении албендазола в низких дозах

Группа	Препарат	Доза, мг/кг	Кратность введения	log ½ титра антител	Индекс действия
1 опытная	албендазол	2,5	однократно	6,8±0,46	1,03
2 опытная	албендазол	5,0	однократно	7,0±0,47	1,06
3 контрольная	-	-	-	6,6±0,77	-

Результаты тестирования гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных тимусзависимым антигеном, при введении албендазола представлены в таблице 2.

Приведенные данные показывают, что однократное пероральное введение албендазола в низких терапевтических дозах 2,5 и 5,0 мг/кг не приводило к существенному изменению интенсивности антителопродукции к тест-антигену. Антитела против иммунизирующего агента обнаруживались в титре, превышающем средние контрольные значения, на 3,0 и 6,1%, соответственно. Индексы действия, равные 1,03 и 1,06, также указывают на толерантность CD⁺4 хелперных клеток, обеспечивающих развитие иммунного ответа гуморального типа (Th2), к албендазолу в испытанных дозах. Накопление антител к тимусзависимому антигену в крови протекало по типу, наблюдаемому у контрольных животных, не получавших препарат. Албендазол не оказывал влияния на интенсивность антителопродукции и, соответственно, на все фазы клеточного цикла В-лимфоцитов: функциональную активизацию, пролиферацию, дифференцировку предшественников В-лимфоцитов, способность вступать в кооперативное взаимодействие с другими клетками и способность реагирования на интерлейкины (фактор роста BCGF и фактор дифференцировки BCDF) [21]. Тестирование способности организма экспериментальных животных к синтезу антител подтверждает ранее полученный результат о толерантности Т-клеточно-опосредованного гуморального иммунитета к албендазолу [16]. Согласно литературным сведениям, применение албендазола снижает уровень как специфических, так и неспецифических антител в крови. Феномен усиления клиренса специфических антител при успешном лечении лиц с цистным гидатидозом и экспериментального трихинеллеза мышей [23, 24] обусловлен, очевидно, резистентностью гуморального иммунного ответа к албендазолу, и указывает на эффективность этиотропной терапии и возможность оценки проведенного лечения с помощью серологических реакций.

Результаты исследований показывают, что албендазол в низких терапевтических дозах 2,5 и 5,0 мг/кг при однократном введении самцам мышей линии СВА×С57BL/6 не обладал иммуотропной активностью. CD⁺4 хелперные клетки Th1 и Th2 клонов, экспрессирующие провоспалительные и противовоспалительные цитокины и реализующие развитие иммунного ответа клеточного (Th1) и гуморального (Th2) типа, толерантны к албендазолу. Албендазол не относится к иммуотропным средствам, поскольку в испытанных дозах не является регулятором клеточных и гуморальных процессов, не способствует модуляции функциональной активности иммуокомпетентных клеток и их кооперативного взаимодействия, необходимых для изменения направленности и интенсивности иммунного ответа.

Литература

1. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков. – Саратов: СВИБХБ, 2007. – 420 с.
2. Urban J.F. et al. Local TH1 and TH2 responses to parasitic infection in the intestine: regulation by IFN-gamma and IL-4 // *Vet. Immunol. and Immunopathol.* – November 1996. – V.54, Issue 1-4. – P. 337-344.
3. Liu Z. et al. Requirements for the development of IL-4-producing T-cells during intestinal nematode

- infection: what it take to make a Th2 cell in vivo // *Immunol. Rev.* – September 2004. – V. 201, Issue 1. – P.57-74.
4. Kreider T., Anthony R.M., Urban J.F., Gause W.C. Alternatively activated macrophages in helminth infections // *Current Opinion in Immunol.* – August 2007. – V. 19, Issue 4. – P. 448-453.
 5. Мамыкова О.И. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов при желудочно-кишечных стронгилятозах овец и их динамика при специфической терапии // *Труды Всесоюзного института гельминтологии.* – М., 1992. – Т. 31. – С. 83-92.
 6. Horton J. Albendazole: abroad spectrum anthelmintic for treatment of individuals and populations // *Current opinion in infect. Dis.* – Desember 2002. – V. 15, Issue 6. – P. 599-608.
 7. Markoski M.M. et al. Praziquantel and albendazole damaging action in vitro developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes. Cestoda) // *Parasitol. Intern.* – March 2006. – V. 55, Issue 1. – P. 51-61.
 8. Mohammadi S.S., Genkider G.M., Loffredo C.A., Singer S.M. A meta-analysis of the effectiveness of Albendazole compared with Metronidazole as treatment for infection with *Giardia duodenalis* // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – May 2010. – V. 4, Issue 5. – P. 682.
 9. Захарянц А.А. Бензимидазолы – конкурентные ингибиторы FAD-содержащей монооксигеназы // *Вестник Московского государственного университета, Серия 2. Химия.* – 2015. – Т. 56. – № 6. – С. 329-335.
 10. Furtado L.F.V., de Aguiar P.H.N., Zuccherato L.W., Teixeira T.T.G. Albendazole resistance induced in *Ancylostoma ceylanicum* is not due to single – nucleotide polymorphisms (SNPs) at codons 167, 198, or 200 of the *betatubulin* gene, indicating another resistance mechanism // *Parasitol. Res.* – 2019. – V. 118. – P. 837-849.
 11. Kitamura K. A Footpad weight assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse // *Immunol. Methods.* – 1980. – V. 39. – N 3. – P. 277-283.
 12. Sever J.L. Application of a micro-technique to viral serological investigation // *J. Immunol.* – 1962. – V. 88. – N 1. – P. 320-328.
 13. Мамыкова О.И. Методические указания по испытанию схем комплексного применения антгельминтных и иммуностимулирующих препаратов // *Труды Всесоюзного института гельминтологии.* – М., 2003. – Т. 39. – С. 353-360.
 14. Рубцова Е.Р., Подымова Н.Г. Исследование иммунотропной активности ингибиторов цАМФ- фосфодиэстеразы кофеина и теофиллина // *Фармакология и токсикология.* – 1986. – № 3. – С.74-77.
 15. Trinchieri G. Regulatory role of T cells producing both interferon γ and interleukin 10 in persistent infection // *J. of Exp. Medicine.* – 2001. – V.194. – N 10. – P. F53-F57.
 16. Мамыкова О.И. Дозозависимый побочный эффект албендазола на реакции клеточного иммунитета. Селективный механизм иммунобиологического действия комбинации рекомбинантного интерлейкина 2 (ронколейкин) и албендазола // *Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: Материалы докладов научной конференции, Москва 19-20 мая 2015.* – М., 2015. – Вып.16. – С. 239-242.
 17. Dvoroznakova E., Porubkova J., Snabel V., Fedorocko P. Immunomodulative effect of liposomized muramyltripeptide phosphatidylethanolamin (L-MTP-PE) on mice with alveolar echinococcosis and treated with albendazole // *Parasitol. Res.* – 2008. – V. 103. – P. 912-929.
 18. Dvoroznakova E., Porubkova J., Sevcikova Z. Immune response of mice with alveolar echinococcosis to therapy with transfer factor, alone and in combination with albendazole // *Parasitol. Res.* – 2009. – V. 105. – P. 1067-1076.
 19. Cooper P.J., Chino M., Sandoval C., Espinal I., Guevara A. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin 2 response to recombinant cholera toxin B subunit following with the live oral cholera vaccine CYD 103-HgR // *Infect. and Immun.* – March, 2001. – V. 69. – N 3. – P. 1574-1580.
 20. Victorov A.V., Yurkiv V.A. Albendazole and colchicines modulate LPS induced secretion of inflammatory mediators by liver macrophages // *Bulletin of Exp. Biol. and Med.* – 2011. – V. 151. – N 6. – P. 627-629.
 21. Утешев Б.С. Механизмы активации и регуляции клеточного цикла В-клеток // *Успехи современной биологии.* – 1988. – Т. 106. – Вып. 3(6). – С. 382-395.
 22. Дьяченко П.А., Дьяченко А.Г. Роль Th17-клеток в патогенезе аутоиммунных заболеваний // *Вестник Сумского государственного университета, Серия Медицина.* – 2010. – № 2. – С. 14-22.
 23. Bonifacino R. et al. Assessment of the immunological surveillance value of humoral and lymphocyte assays in severe human cystic echinococcosis // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* – 2000. – V. 94, Issue 1. – P. 97-102.
 24. Мамыкова О.И., Написанова Л.А. Эффективность применения ронколейкина в комплексной терапии экспериментального трихинеллеза мышей // *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.* – 2012. – № 2. – С. 51- 54.

Поступила в редакцию 10.08.20
 После доработки 30.09.20
 Принята к публикации 08.10.20