Материалы IV научно-практической конференции Международной ассоциации паразитоценологов (г. Витебск, 4-5 ноября 2010 г.) / ред. А. И. Ятусевич [и др.]. - Витебск : ВГАВМ, 2010. - 244 с.

УДК 619:615.37

ИММУНОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА ФОРВЕТ

Василевич Ф.И., Шемякова С.А.
ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина», г.Москва, Россия

С целью перспективности применения для иммунопрофилактики фасциолеза крупного рогатого скота были изучены иммунотоксические свойства нового противовирусного и иммуномодулирующего препарата Форвет, предназначенного для профилактики и применения в комплексной терапии желудочно-кишечных заболеваний, разработанного ООО «Национальная исследовательская компания».

Форвет в терапевтической дозе 0,4 мл/кг массы тела оказывает стимулирующее влияние на показатели гуморального иммунного ответа, повышая ИС в реакциях гетерофильных агглютининов, и особенно Т-систему иммунитета, что выражается в повышении активности иммунокомпетентных клеток, взаимодействие которых и обуславливает развитие иммунного ответа у животных.

With the purpose of perspectivity of application for immunological Preventive maintenance fasciolesis large horned livestock have been investigated immunotoksicology properties new preparation Forvet intended for preventive maintenance and application in complex therapy of gastroenteric diseases, developed Open Company «National research company».

Forvet in a therapeutic doze of weight of a body of 0,4 ml/kg stimulating influence on parameters gumoralis the immune answer, raising IS in reactions geterofilus agglutinins and, especially renders, T-system of immunity that is expressed in increase of activity immunocompetens cells which interaction causes development of the immune answer in animals.

Введение. Как гельминты, так и дегельминтизации вызывают у животных вторичные иммунодефициты. Проявление такого состояния, как иммуносупрессия, выдвигает на первый план необходимость коррекции иммунного ответа путем мобилизации иммуногенетического потенциала организма, т.е. регуляции иммунологической реактивности с помощью препаратов - иммуномодуляторов, которые при различных инфекциях и инвазиях должны проявлять стимулирующий эффект (Мамыкова О.И., 1989; Ватников Ю.А., 1991; Даугалиева Э.Х., Филиппов В.В., 1991).

С целью применения для иммунопрофилактики фасциолеза курпного рогатого скота нами был изучен новый препарат Форвет – противовирусное и иммуномодулирующее лекарственное средство, предназначенное для профилактики и применения в комплексной терапии желудочно-кишечных заболеваний.

Препарат разработан ООО «Национальная исследовательская компания». Нами были изучены иммунотоксические свойства препарата.

Материалы и методы. Исследования проводили в 2010 г. на кафедре паразитологии и инвазионных болезней животных ФГОУ ВПО «МГАВМиБ им. К.И.Скрябина». Иммунотоксические свойства препарата Форвет изучали в 4 опытах на 100 мышах линии СВА массой 18-20 г.

Изучение действия иммуномодуляторов на клеточное звено иммунного ответа предполагает использование модельных систем, дающих представление о функциональной активности лимфоцитов Т-ряда. К таким тестам относится реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и определение изменения количества ауторозеткообразующих клеток, которые у мышей аналогичны Т-лимфоцитам. Ауто-РОК представляют собой посттимические клетки - предшественники Т-лимфоцитов, которые под влиянием сывороточного тимического фактора и интерлейкина-2 превращаются в зрелые клетки-хелперы и являются своеобразным резервом иммунной системы.

Для определения АОК в селезенке мышам внутривенно вводили в терапевтической дозе препарат одновременно с внутрибрюшинной иммунизацией их эритроцитами барана (ЭБ) – 2 % взвесь в объеме 0,5 мл/мышь.

На 4-е сутки извлекли селезенки, получали лимфоциты и проводили исследование. Вокруг каждой антителообразующей клетки возникает зона гемолиза, которая видна на агаре в виде прозрачной точки. Увеличение числа продуцентов антител в селезенке мышей, которым введен препарат, свидетельствует о стимулирующем действии препарата на антителообразование, снижении их числа по сравнению с контролем (ЭБ) – об его угнетении. Индекс стимуляции (ИС) определяли как отношение числа АОК в опыте к числу АОК в контроле (введение только ЭБ). ИС 1,5 и выше – стимулятор, ниже 0,7 – иммунодепрессант.

Титр гетерофильных агглютининов. Гетерофильные агглютинины относятся к группе нормальных антител и являются одним из естественных факторов защиты организма, первичного неспецифического иммунитета. Эти тела образуются в результате спонтанной иммунизации антигенами, которые широко распространены в природе. Количество гетерофильных агглютининов определяли с помощью реакции Пауля-Буннеля в модификации Е.Ф.Чернушенко и Л.С.Когосовой (1978).

Постановка реакции. 0,5 мл испытуемой сыворотки после предварительной инактивации на водяной бане при 56°С в течение 30 мин разводили от 1:4 до 1:64. К каждому разведению добавляли по 0,5 мл 3%-ной взвеси эритроцитов барана, после чего пробирки с растворами помещали на 2 часа в термостат при температуре 37°С, а затем на 24 часа в холодильник. Искомым считали последнее разведение, в котором еще имеются агглютинирующие эритроциты.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ). Линейным мышам-самцам массой 20-25 г внутрибрюшинно однократно за

7 сут до сенсибилизации 2% взвесью эритроцитов барана в дозе 0,5 мл, вводили препарат в испытуемой дозе. Для выявления сенсибилизации мышей им на 5-е сут в подушечки задних правых лап подкожно вводили 10% суспензию эритроцитов барана в дозе 0,05 мл (разрешающая инъекция), а в подушечки всех левых задних лап - физраствор в той же дозе. Через 24 часа оценивали местную воспалительную реакцию по разнице масс опытных и контрольных лап. Для этого животных убивали, обе задних лапы отрезали сразу же по выступу кости ниже сочленения мало- и большеберцовой кости и выше пяточного сустава.

Индекс реакции вычисляли для каждой мыши по формуле:

$$ИР = \frac{P_o - P_к}{P_к} \times 100\%;$$ где

P_o - масса опытной лапы;

$P_к$ - масса контрольной лапы.

Контролем служили интактные мыши не иммунизированные, но получавшие разрешающую дозу ЭБ (0,05 мл). Введение любых препаратов, влияющих на клеточное звено иммунитета, вызывает сдвиг индекса.

Результатыисследований. Судя по полученным в опыте 1 данным, введение Форвета в терапевтической дозе 0,4 мл/кг приводит к активизации трансформации В-лимфоцитов в АОК по сравнению с контролем, что выражалось в статистически достоверном увеличении количества АОК в селезенке. ИС увеличился в 3,05 раза, что говорит о стимулирующем воздействии препарата на антителогенез, т.е. Форвет усиливает гуморальный иммунный ответ у животных. Увеличение содержания АОК предшественников В-лимфоцитов, по-видимому, связано с активизацией функциональной активности Т-лимфоцитов.

Результаты этого опыта представлены в таблице 1.

Таблица 1 - **Изменение количества антителопродуцентов (АОК) в селезенке после введения препарата**

Препарат	Доза	ИС=О:К
Форвет	0,4 мл/кг	3,67±0,04*
Контроль ЭБ	2% - 0,5 мл	1,2±0,01

**достоверно по отношению к контролю, * - P<0,05*

Во втором опыте определяли изменение титров антител в сыворотке крови мышей при введении препарата. Известно, что вещества, обладающие стимулирующим эффектом, вызывают увеличение концентрации антител по сравнению с контролем.

После введения препарата на 7-й день титры агглютининов в сыворотке крови мышей 1-й группы повысились до 6,8 (log_2). У

контрольных животных этот показатель был на уровне 2,7 (log_2). Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 - **Титры гетерофильных агглютининов**

Препарат	Доза	Результаты реакции	
		7-й день	ИС=(О:К)
Форвет	0,4 мл/кг	6,8±0,7*	3,2
Контроль	ЭБ	2,1±0,7	-

* - *P<0,05*

На основании результатов проведенных исследований можно заключить, что однократное применение Форвета сопровождается усилением иммунного ответа на тимусзависимый антиген (ЭБ). По-видимому, в данном случае отсутствует подавление Т-супрессором активности В-лимфоцитов в отношении Т-зависимого антигена.

Гуморальная антителопродукция к тимусзависимому антитгену (ЭБ) обусловлена кооперативным взаимодействием В-лимфоцитов и Т-хелперной популяцией иммунокомпетентных клеток (Петров Р.В., 1976).

Форвет оказывает стимулирующее воздействие на гуморальный иммунный ответ, что выражается повышением индекса стимуляции до 3,2.

Опыт 3. Одновременно с внутривенным введением тестируемого препарата мышей внугрибрюшинно иммунизировали 2% взвесью ЭБ. На 5-е сутки вводили разрешающую дозу ЭБ - 10 % взвесь в объеме 0,02 мл в подушечки правых лап, в коллатеральную лапу вводили 0,9 % раствор NaCl. Через 24 часа определяли сдвиг ИС. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - **Результаты реакции гиперчувствительности замедленного типа**

Препарат	Доза	$\frac{(О-К) \times 100\%}{К}$
Форвет	1 мл/кг	26,8±3,2*
Контроль	Только разрешающая доза ЭБ	10,8±2,9

**достоверно по отношению к контролю, P<0,05*

Установлено, что Форвет в терапевтической дозе вызывают индукцию ГЗТ у мышей, т.е. местную воспалительную реакцию, которая обусловлена инфильтрацией клетками воспалительного очага, а не сосудистой реакцией. У мышей это полиморфноядерные лейкоциты, мононуклеары, которые через несколько дней превращаются в тканевые макрофаги. Введение Форвета вызывало сдвиг ИС на 26,8 %, что достоверно отличалось от показателей контрольных животных - 10,8 %. Усиление РГЗТ под влиянием Форвета указывает на способность препарата стимулировать продукцию лимфокинов - медиаторов клеточного

иммунитета. Интенсивность синтеза и секреции лимфоцитами факторов клеточного иммунитета соответствует степени выраженности воспалительной реакции в месте введения разрешающей дозы антигена (ЭБ) и характеризует активность популяции хелперных клеток, ответственных за проявление реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Опыт 4. При изучении динамики ауто-РОК у мышей после введения Форвета (таблица 4) установлено, что статистически достоверное увеличение ауто-РОК было выраженным у животных, получавших Форвет. При введении Форвета интактным мышам кинетика ауто-РОК характеризовалась повышением как абсолютного, так и относительного количества розеткообразующих клеток в крови мышей.

Таблица 4 - **Динамика ауто-РОК в периферической крови мышей**

Препарат	Фон	5-й день	10-й день	15-й день	20-й день
Форвет	0,9±0,1 41,6±3,7	11,3±2,9* 47,65±1,6	13,6±2,8* 68,3±7,5	18,9±2,1* 75,1±2,2	12,5±1,9* 56,5±2,3
контроль	0,9±0,01 24,8±1,3	1,0±0,02 32,8±2,9	2,1±0,01 35,4±2,5	1,0±0,05 36,1±5,3	1,2±0,03 49,9±3,7

**достоверно по отношению к контролю. $P<0,05$*

Максимальных значений показатели достигли на 10-15-е сутки - 13,6 и 16,4 % (68,3 и 75,1 кл./мкл) соответственно. Относительное и абсолютное количество ауто-РОК, которое было зарегистрировано у интактных животных (контрольных), не получавших препарата составило – 0,9-2,1 % (24,8±1,3-35,4±2,5).

К концу срока наблюдений (20-й день) количество ауто-РОК составляло у мышей подопытной группы 12,5 % или 56,5 кл./мкл, достоверно превышая значения, полученные у животных контрольной группы.

Заключение. Форвет в терапевтической дозе 0,4 мл/кг массы тела оказывает стимулирующее влияние на показатели гуморального иммунного ответа, повышая ИС в реакциях гетерофильных агглютининов, и особенно Т-систему иммунитета, что выражается в повышении активности иммунокомпетентных клеток, взаимодействие которых и обуславливает развитие иммунного ответа у животных ($ИС_{гэт}$ 26,8 %, увеличение содержания ауто-РОК в крови до 18,9 %).

Литература

1. Ватников Ю. А. Иммунопрофилактика фасциолеза овец // Тезисы докл. Всес. науч. конф., М. – 1991. – С. 21-22. 2. Даугалиева Э.Х., Филиппов В.В. Иммунный статус и пути его коррекции при гельминтозах сельскохозяйственных животных. – М.: Агропромиздат. 1991. – 188 с. 3. Мамыкова О.И. Оценка иммунобиологического статуса животных после дегельминтизации и пути его коррекции.// Автореф. дисс….канд. вет.

наук. - М.- 1989.- 20 с. 4. Петров Р.В. Иммунология и иммуногенетика. – М.: Медицина, 1976. – 326 с.

УДК: 619:636.2:616.9

АКТИНОМИКОЗ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ПСЕВДОАЛЛЕРГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НА ТУБЕРКУЛИН

Гринченко Д.Н., Апатенко В.М.
Харьковская государственная зооветеринарная академия, Украина.

Актиномикоз приобрел широкое распространение с массовыми вспышками и с охватом молодняка крупного рогатого скота. Возбудитель актиномикоза Actinomyces bovis обладает сенсибилизирующими свойствами и обусловливает псевдоаллергическую реакцию крупного рогатого скота на туберкулин PPD.

ACTINOMYCOSIS OF CATTLE AND PSEUDOALLERGIC REACTIONS ON TUBERCULIN

Grinchenko D.M., Apatenko V.M., Kharkov state zooveterinary academy.

Actinomycosis of cattle acquire wide distribution with mass flashes and with the envelopment of calfs. Diseassed-producing microbe of actinomycosis *Actinomyces bovis possesse sensible properties and stipulate the pseudoallergic reaction of cattle on the tuberculin PPD.*

Введение. Актиномикоз в последнее время приобрел широкое распространение и причиняет значительные экономические убытки. Актиномикоз отнесен к оппортунистическим инфекциям, но отмечены случаи массового поражения животных с диффузным разрастанием актиномиком, с преимущественным охватом откормочного молодняка и заболеванием новорожденных телят при внутриутробном заражении [2].

Эти данные свидетельствуют об усилении патогенных качеств у возбудителя актиномикоза Actinomyces bovis и снижении естественной резистентности, недостаточности иммунной защиты животных.

По своим антигенным качествам A. bovis обладает сенсибилизирующей активностью и обусловливает псевдоаллергическую реакцию у крупного рогатого скота на туберкулин при его внутрикожном введении при исследовании на туберкулез [5].

Такие псевдоаллергические реакции весьма распространены при ряде паразитарных заболеваний [9], вызываемых Nocardia asteroids, родственным A. bovis и также вызывающим образование некротических узелков [4]. Все это указывает на распространенность этого явления и серьезность данной диагностической проблемы.

Материалы и методы. Исследования проводились в хозяйстве, где актиномикоз отмечался у значительной части поголовья молодняка