

УДК615.099-616.2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ И ИММУНОТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА ОЦИЛЛОКОКЦИНУМ

Л.П. Коваленко,
А.В. Таллерова,
О.С. Кузнецова,
А.С. Лапицкая

ФГБУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова»
РАМН 125315, г. Москва,
Российская Федерация

Проведено экспериментальное изучение аллергенности и иммунотоксичности препарата оциллококцинум. Иммунизация морских свинок оциллококцинумом в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг по стандартной схеме или в смеси с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) не вызывала у животных системной реакции анафилаксии или аллергических реакций замедленного типа. Однократное введение оциллококцинума в/ж в дозах 100 мг/кг и 500 м/кг мышам линии СВА не вызывало значимых изменений по сравнению с контролем в реакции воспаления на канавалин А (Кон А).

При оценке иммунотоксических свойств оциллококцинума препарат вводили мышам внутривенно 14 дней в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг. Введение оциллококцинума мышам F₁ (СВА x С57ВL/6) в дозе 500 мг/кг приводило к достоверному увеличению индекса массы тимуса на 25,1 %. У мышей гибридов F₁ (СВА x С57ВL/6) курсовое введение оциллококцинума в дозах 100 и 500 мг/кг вызывало выраженное увеличение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, у мышей линии С57ВL/6 значительно стимулировало гуморальный иммунный ответ.

Таким образом, оциллококцинум в исследованном диапазоне доз не оказывает аллергизирующего и иммунотоксического действия, стимулирует фагоцитарную активность макрофагов и гуморальный иммунный ответ, что можно рассматривать как один из важных механизмов действия препарата, применяемого при гриппе и других ОРВИ.

Ключевые слова: препарат оциллококцинум, реакция системной анафилаксии, гиперчувствительность замедленного типа, реакция воспаления на Кон А, фагоцитоз, хемилюминесценция, гуморальный иммунный ответ, клеточный иммунный ответ, иммунотоксичность.

Введение. По данным ВОЗ в мире ежегодно регистрируется 1,5 миллиарда случаев острых респираторных заболеваний, причем наиболее высокий уровень заболеваемости отмечен у детей дошкольного и младшего школьного возраста, посещающих организованные коллективы.

Эффективность применения препарата оциллококцинум, сокращающего продолжи-

тельность заболевания при гриппе и других ОРВИ, была показана в клинических исследованиях, проведенных во Франции и Германии [1]. При проведении клинических испытаний среди часто болеющих детей в России был отмечен положительный эффект препарата у детей, относящихся к группам риска и сделано заключение о целесообразности использования оциллококцинума для профилактики

Коваленко Лариса Петровна (Kovalenko Larisa Petrovna), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательского института фармакологии имени В.В. Закусова» Российской академии медицинских наук, kovalenko.larisa@mail.ru

Таллерова Анна Вадимовна (Tallerova Anna Vadimovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательского института фармакологии имени В.В. Закусова» Российской академии медицинских наук, annatal@rambler.ru

Кузнецова Ольга Сергеевна (Kuznetsova Olga Sergeevna), младший научный сотрудник сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательского института фармакологии имени В.В. Закусова» Российской академии медицинских наук, olgapharm@inbox.ru

Лапицкая Анастасия Сергеевна (Lapitskaya Anastasya Sergeevna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательского института фармакологии имени В.В. Закусова» Российской академии медицинских наук, lapitskaia.n@mail.ru

в детских садах и для семейной профилактики в период острого сезонного подъема заболеваемости ОРВИ [2].

Было показано, что у детей оциллококцинумом усиливал выработку интерферона- α и индуцированного интерферона- γ , стимулирующего макрофаги и натуральные киллеры и обладающего способностью индуцировать противовирусный иммунитет [3].

В связи с перспективами широкого использования препарата в настоящей работе была про-

ведена оценка аллергизирующих свойств и иммуноотоксичности оциллококцинума.

Материалы и методы исследования. Выбор методов, использованных при изучении аллергизирующих свойств и иммуноотоксичности препарата оциллококцинумом, определялся требованиями, изложенными в сборнике «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012) и международной практикой изучения иммуноотоксичности. Все методы верифицированы и используются в экспертных и на-

Таблица 1

Влияние оциллококцинума на реакцию воспаления на Кон А

Доза препарата	Число животных в группе	Индекс реакции
Контроль дистиллированная вода	10	13,0 ± 2,0
Оциллококцинумом 100 мг/кг	10	12,6 ± 2,2
Оциллококцинумом 500 мг/кг	10	8,6 ± 2,0

Таблица 2

Индекс масса и клеточность лимфоидных органов (% от массы тела) мышей-самцов F₁ (СВА С57BL/6) при пероральном введении оциллококцинума в течение 14-ти дней

Органы лимфоидной системы n=10	Контроль		Оциллококцинумом (100 мг/кг)		Оциллококцинумом (500 мг/кг)	
	Индекс массы (%)	клеточность $\frac{n \cdot 10^6 \text{ клеток}}{\text{мл} \cdot m_{\text{органа}}}$	Индекс массы (%)	клеточность $\frac{n \cdot 10^6 \text{ клеток}}{\text{мл} \cdot g_{\text{органа}}}$	Индекс массы (%)	клеточность $\frac{n \cdot 10^6 \text{ клеток}}{\text{мл} \cdot g_{\text{органа}}}$
Селезенка	0,416 ± 0,015	70,1±5,2	0,408 ± 0,007	69,5±4,1	0,402 ± 0,010	72,5±4,9
Тимус	0,183 ± 0,010	23,0±3,3	0,203 ± 0,011	25,1±4,3	0,229 ± 0,010**	28,6±3,9
Подколенные лимфоузлы	0,048 ± 0,007	4,9±0,5	0,052 ± 0,003	5,2±0,3	0,044 ± 0,005	4,8±0,7

Примечание: n – количество животных; ** - p<0,01 по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента

Таблица 3

Влияние оциллококцинума на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов при пероральном введении препарата в течение 14 дней

Доза оциллококцинума	Фагоцитарный индекс (усл.ед.)	Уровень значимости
Контроль (n=10)	5,7 ± 1,2	
14-дневное введение в/ж 100 мг/кг(n=10)	23,1 ± 3,3	p<0,01
14-дневное в/ж введение 500 мг/кг (n=10)	22,7 ± 6,7	p<0,05

Примечание: n – количество животных в группе p - достоверность различий по сравнению с контрольной группой по t - критерию Стьюдента

учных исследованиях иммунотоксичности синтетических и природных соединений [4-6].

Эксперименты выполнены на самцах морских свинок альбиносов массой 250-300 г и самцах мышей линии СВА, С57BL/6 и гибридов F₁ (СВА х С57BL/6) массой 18-20 г, полученных из питомников РАМН, после двухнедельного карантина. Животных содержали в условиях вивария ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН в соответствии с санитарными нормами, предусмотренными «Правилами лабораторной практики» (Приказ Министерства Здравоохранения и Социального развития РФ от 23 августа 2010 г. №708 н) при свободном доступе к воде и сбалансированному по питательности брикетированному гранулированному комбикорму фирмы «МЭСТ». Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела.

В работе использовали оциллококцинум (производитель – лаборатория Буарон, Франция, серия 113504). Согласно инструкции по применению, препарат оциллококцинум принимают перорально 2-3 раза в день раз в день по 1000 мг (суточная доза 2000-4000 мг). В связи с этим дозы препарата при введении морским свинкам альбиносам и мышам линий СВА, С57BL/6 и гибридам F₁ (СВА х С57BL/6) были определены равными 100 мг/кг и 500 мг/кг. Препарат разводили в дистиллированной воде. В предварительной серии экспериментов на 6 морских свинках альбиносах массой 250-300 г изучали кожно-раздражающее действие от внутрикожного (в/к) введения 0,05 мл оциллококцинума в концентрациях 1 мг/мл, 10 мг/мл и 100 мг/мл. На выстриженных правом и левом боках спины животным вводили в/к оциллококцинум и 0,05 мл стерильного физиологического раствора в качестве контроля. Внутрикожное введение оциллококцинума в концентрации 100 мг/мл вызывало у 2-х из 6-ти свинок кожно-раздражающее действие, в

концентрациях 1 мг/мл и 10 мг/мл кожно-раздражающего действия не выявлено, поэтому в качестве разрешающей дозы для реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) было выбрано в/к введение препарата в концентрации 10 мг/мл.

При постановке анафилактического шока морским свинкам альбиносам вводили оциллококцинум по стандартной схеме в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг [4], контрольным животным вводили соответствующий объем дистиллированной воды. Учет интенсивности анафилактического шока проводили в индексах по Weigle [4]. Реакцию воспаления на Кон А проводили на мышах самцах линии СВА. Оциллококцинум вводили однократно в/ж в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг. Животным контрольной группы аналогичным способом вводили стерильный физиологический раствор.

При оценке иммунотоксических свойств оциллококцинума препарат вводили мышам в/ж 14 дней в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг. Контрольным животным вводили соответствующий объем растворителя. Для изучения фагоцитоза перитонеальных макрофагов были использованы частицы коллоидной туши. Через 24 часа после окончания введения оциллококцинума фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов оценивали по интенсивности захвата ими частиц туши, введенной животным внутрибрюшинно в виде 0,05% суспензии в объеме 2мл. Определение антител в реакции гемагглютинации (РПГА) к эритроцитам барана (ЭБ) выполнено на мышах двух оппозитно реагирующих на ЭБ линий СВА и С57BL/6.

Подготовка к работе первичных данных и расчеты проводились в среде пакета статистических программ (PSP) STATISTICA (версия 6.0) для WINDOWS. Статистический анализ данных проводился с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Иммунизация морских свинок 1-й и 2-й опытных групп оцилло-

Таблица 4

Влияние оциллококцинума на показатели хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на зимозан

Доза оциллококцинума	ΔI , (mv)	Уровень значимости	S, (ед.)	Уровень значимости
Контроль (n=10)	29,5 ± 6,6		23726,9 ± 5186,1	
14-дневное введение в/ж 100 мг/кг (n=10)	24,0 ± 5,9	p>0,05	19173,1 ± 4553,1	p>0,05
14-дневное в/ж введение 500 мг/кг (n=10)	18,1 ± 5,8	p>0,05	13489,9 ± 3553,1	p>0,05

Примечание: n – количество животных; ΔI – показатель уровня активированной хемилюминесценции; S – интегральный показатель хемилюминесценции.

p - достоверность различий по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента.

Таблица 5

Влияние оциллококцинума на гуморальный иммунитет (РПГА) при в/ж введении препарата в течение 14-ти дней

Доза оциллококцинума	Величина иммунного ответа при антигенной нагрузке 5×10^7 ЭБ			
	СВА		С57BL/6	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
100 мг/кг	$5,9 \pm 0,2$ n=10	$6,2 \pm 0,2$ n=10	$4,5 \pm 0,2$ n=10	$5,7 \pm 0,3$ n=10, p<0,05
500 мг/кг	$5,9 \pm 0,2$ n=10	$5,7 \pm 0,3$ n=10	$4,5 \pm 0,2$ n=10	$5,4 \pm 0,3$ n=10, p<0,05

Примечание: в таблице представлены средние величины титра антител в \log_2
n – число животных в группе.

Таблица 6

Влияние оциллококцинума на клеточный иммунитет (ГЗТ) при в/ж введении препарата в течение 14-ти дней

Доза препарата	Индекс реакции: $I_p = \frac{P_{оп} - P_k}{P_k} \times 100 \%$	Уровень значимости
Контроль	$48,2 \pm 5,2$, n=10	
100 мг/кг	$60,8 \pm 3,3$, n=10	p>0,05
500 мг/кг	$57,8 \pm 2,9$, n=10	p>0,05

кокцинумом в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг при внутрисердечном введении разрешающей дозы препарата на 16 день опыта не вызывала у животных симптомов системной реакции анафилаксии. Иммунизация морских свинок 3-й и 4-й опытных групп оциллококцинумом в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг в смеси с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) не приводила к аллергическим реакциям замедленного типа при внутрикожном введении разрешающей дозы препарата на 21-й день опыта.

Однократное в/ж введение препарата оциллококцинумом в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг не вызывало у мышей линии СВА значимых изменений реакции воспаления на Кон А по сравнению с контрольной группой (таб. 1).

При оценке действия оциллококцинума на массу и клеточность лимфоидных органов мышей гибридов F_1 установлено, что введение препарата в течение 14 дней в дозе 500 мг/кг приводит к достоверному увеличению массы тимуса на 25,1 % и не влияет на массу селезёнки и подколенных лимфоузлов (таб. 2).

Двухнедельное введение оциллококцинума в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг вызывало (лишнее слово) выраженное увеличение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов в 4,1 и 3,9 раза, соответственно (таб. 3).

Внутрижелудочное 14-ти дневное введение оциллококцинума в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг не оказывало достоверного влияния на параметры хемилюминесценции полиморфоядерных гранулоцитов, активированных опсонизированным зимозаном (таб.4).

Введение оциллококцинума в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг мышам линии С57BL/6, слабореагирующей на тимусзависимый антиген (ЭБ), вызывало значимую стимуляцию гуморального иммунного ответа, введение оциллококцинума мышам линии СВА не оказывало достоверных изменений антителообразования по сравнению с контролем (таб. 5).

Влияние оциллококцинума на клеточный иммунный ответ изучали по реакции ГЗТ в опытах на мышцах гибридах F_1 (СВАхС57BL/6). Результаты опытов представлены в таб. 6. После перо-

рального введения осциллококцинума в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг в течение 14 дней не обнаружено значимого изменения реакции ГЗТ по сравнению с контролем.

Заключение. Широкому распространению бактериально-вирусных инфекций способствует ослаблению иммунитета, в частности защитных многофункциональных свойств фагоцитарных клеток и угнетение лимфоцитарно-макрофагальной системы токсичными белками вириона гриппа. Прямая и опосредованная активность макрофагов при вирусных инфекциях определя-

ется их функциональным состоянием, характеризующим их способность поглощать и элиминировать вирусы и инфицированные ими клетки и продуцировать провоспалительные цитокины и интерфероны [7,8]. Выраженное усиление фагоцитарной активности макрофагов и гуморального иммунного ответа под действием осциллококцинума можно рассматривать как один из важных механизмов действия препарата. В исследованном диапазоне доз осциллококцинума не обладал алергизирующими и иммуноотоксическими свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Селькова Е.П., Семенов Т.А., Горбачев И.А. Применение Осциллококцинума для профилактики гриппа и ОРВИ. Инфекционные болезни. 2005; 4(3):74-78.
2. Казюкова Т.В., Панкратов И.В., Самсыгина Г.А., Алев А.С., Дудина Т.А. Возможности семейной профилактики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций. Педиатрия. 2010; 89 (65): 112-117.
3. Селькова Е.П., Волчецкий А.Л., А.С. Лапицкая, Е.Ю. Радциг, Н.В. Ермилова. Влияние Осциллококцинума на интерферонобразование у часто болеющих детей. Педиатрия. 2009; 88 (4): 42-47
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по оценке алергизирующих свойств лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012, 51- 63.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по оценке иммуноотоксического действия фармакологических веществ. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012, 64- 79.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по доклиническому изучению иммуноотропной активности фармакологических
7. Ivanova E., Toshkova R., Sekedjjeva J.-A. plant polyphenol-rich extract restores the suppressed functions of fagocytes in influenza virus-infected mice. Microbes and Infection. 2005; 7:391-3
8. Плехова Н.Г. Значение клеток моноцитарно-макрофагальной системы в патогенезе флавивирусных инфекций. Бюллетень СО РАМН: 2007; 4(126):71-

REFERENCES:

1. Sel'kova E.P., Volchetskiy A.L., Lapitskaya A.S., Radtsig E.Yu., Ermilova N.V. Oscillococcinum influence on interferonogenesis in frequently sickly children. *Pediatrya*. 2009; 88 (4): 42-47 (in Russian).
2. Kazyukova T.V., Pankratov I.V., Samsygina G.A., Alev A.S., Dudina T.A. Possibility of family prevention of influenza and acute respiratory viral infections. *Pediatrya*. 2010; 89 (65): 112-117 (in Russian).
3. Guidelines of pre-clinical studies of drugs, 2012 year. Assessment of allergenic properties of drugs. Part Moscow: Grif i K; 2012; 51- 63 (in Russian).
4. Guidelines of pre-clinical studies of drugs, 2012 year. Assessment of immunotoxicology action of pharmacological substances. Part Moscow: Grif i K; 2012; 626-656 (in Russian).
5. Guidelines of pre-clinical studies of drugs, 2012 year. Preclinical studies immunotropic activity of pharmacological agents. Part Moscow: Grif i K; 2012; 626-656 (in Russian).
6. Ivanova E., Toshkova R., Sekedjjeva J.A. plant polyphenol-rich extract restores the suppressed functions of fagocytes in influenza virus-infected mice. *Microbes and Infection*: 2005; 7: 391-398.
7. Plekhova H.G. Implication of monocyte-macrophage system in the pathogenesis of flavivirus infections. *Byulleten' SO RAMN*: 2007; 126(4):71-77 (in Russian).

L.P. Kovalenko, A.V. Tallerova, O.S. Kuznetsova, A.S. Lapitskaya

EXPERIMENTAL STUDY OF ALLERGENIC PROPERTIES AND IMMUNOTOXICITY OF THE DRUG OSCILLOCOCCINUM

Federal State Budgetary Institution «V.V. Zakusov Institute of Pharmacology», Russian Academy of Medical Science, 125315, Moscow, Russian Federation

Allergenicity and immunotoxicity of oscillococcinum preparation was experimentally studied. Immunization of guinea pigs with oscillococcinum in doses of 100 mg/kg and 500 mg/kg according to a standard scheme or mixed with complete Freund's adjuvant (CFA) did not provoke a systemic anaphylactic reactions or delayed allergenic reactions in animals. A single administration of oscillococcinum per os in doses of 100 mg/kg and 500 mg/kg to CBA strain mice did not cause significant changes in comparison with the control in the inflammation response to concanavalin A (Con.A).

To assess oscillococcinum immunotoxic properties, the preparation was perorally administrated to mice in doses of 100 mg/kg and 500 mg/kg for 14 days. Delivery of oscillococcinum in the dose of 500 mg/kg to F₁ mice resulted in an authentic increase by 25.1% of thymus mass index. In F₁ hybrid mice (CBA x C57BL/6), a course delivery of oscillococcinum induced an expressed increase of peritoneal macrophage phagocytic activity, in C57BL/6 strain mice it significantly stimulated humoral immune response. Thus, oscillococcinum in the dose range investigated does not produce allergenic and immunotoxic action, stimulates macrophage phagocytic activity and humoral response which could be considered one of the most important mechanisms of the preparation action used to cure flu and other acute respiratory viral infections.

Key passwords: *oscillococcinum preparation, systemic anaphylactic reaction, delayed hypersensitivity, inflammation response to concanavalin A, phagocytosis, hemiluminescence, cellular immune response, immunotoxicity*

Материал поступил в редакцию 30.01.2014 г.