

У№ДК 615.099-616.2

ОЦЕНКА АЛЛЕРГЕННОСТИ И ИММУНОТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА СТОДАЛЬ

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

Проведена оценка аллергенности и иммунотоксичности препарата стодаль. Иммунизация морских свинок препаратом Стодаль по стандартной схеме в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг или в смеси с полным адьювантом Фрейнда не вызывала системной реакции анафилаксии или аллергических реакций замедленного типа. Введение препарата Стодальвнутрижелудочно (в/ж) в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг мышам линии СВА не оказывало влияния на реакцию воспаления на конканавалин А (Кон А).

У мышей F_1 (СВА х С57BL/6) стодаль, вводимый в/ж в течение 14 дней, в дозе 1 мл/кг вызывал значимое увеличение индекса массы и клеточности тимуса на 41,5 % и 28,7 %, в дозе 10 мг/кг - массы тимуса на 20,8 %. Введение препарата в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг не влияло на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и на показатели хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на опсонизированный зимозан. Двухнедельное введение препарата Стодаль в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг мышам линий СВА и С57BL/6 вызывало значимую стимуляцию гуморального иммунного ответа. У мышей гибридов F_1 (СВА х С57BL/6) введение в дозе 1 мл/кг вызывало достоверное увеличение показателей клеточного иммунитета.

Таким образом, препарат Стодаль в диапазоне изученных доз не вызывает аллергических реакций немедленного и замедленного типа и псевдоаллергических реакций, стимулирует гуморальный и клеточный иммунитет и не оказывает иммунотоксического действия.

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

Введение. Фитотерапевтические препараты получили широкое распространение в качестве средств профилактики и адьювантной терапии широкого круга заболеваний. Необходимость их токсикологической оценки неоднократно подчеркивалась в современной литературе [1].

Комплексный фитопрепарат препарат Стодаль применяется при симптоматическом лечении кашля различной этиологии. Показано, что по эффективности препарат не уступает кодеин-содержащим и другим традиционным противокашлевым лекарственным средствам [2,3]. Противопоказанием к применению стодаля является повышенная индивидуальная чувстви-

тельность к отдельным компонентам препарата. В частности, возможны аллергические реакции к компонентам препарата *Bryonia* и *Pulsatilla* [4].

Целью настоящего исследования явилась экспериментальная оценка аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия препарата стодаль.

Материалы и методы исследования. В исследовании использован противокашлевый препарат Стодаль производства лаборатории «Буарон», Франция. Стодаль является комплексным фитопрепаратом в состав которого, на каждые 100 г препарата входят *Pulsatilla*, *Rumex crispus*, *Bryonia*, *Ipeca*, *Spongia tosta*, *Sticta pulmonaria*,

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, г. Москва, 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, г. Москва, annatall@rambler.ru

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

Antimonium tartaricum, Myocarde, Coccus cacti, Drosera (по 0,95 г каждый) и вспомогательные компоненты (сироп Толу 19,0 г, сироп Полигала 19,0 г, этанол 96 % 0,340 г, карамель 0,125 г, бензойная кислота 0,085 г, сироп сахарозы до 100 г).

Выбор тест-систем и других параметров экспериментов, использованных при оценке аллергизирующих свойств и иммуноотоксичности препарата стодаль, определялся требованиями, изложенными в соответствующих методических документах [5-7].

В работе использовали самцов морских свинок альбиносов массой 250-300 г и самцов мышей линий СВА, С57BL/6 и гибридов F₁ (СВА х С57BL/6) массой 18-20 грамм, полученных из питомников РАМН, после двухнедельного карантина в виварии института. Животных содержали в условиях вивария 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 качестве определяющего показателя.

Согласно инструкции по применению (производитель – лаборатория Буарон, Франция, серия M1103225), препарат Стодаль принимают перорально 3-5 раз в день по 15 мл (суточная доза 45-75 мл). В связи с этим дозы препарата при введении морским свинкам альбиносам и мышам линий СВА, С57BL/6 и гибридов F₁ (СВА х С57BL/6) составляли 1 мл/кг и на порядок выше -10 мл/кг. В предварительной серии экспериментов на 6 морских свинок альбиносах массой 250-300 г изучали кожнораздражающее действие от внутрикожного (в/к) введения 0,05 мл стодала в 1%, 10 % и 20% концентрациях. На выстриженных правом и левом боках спины животным вводили в/к препарат Стодаль и в качестве контроля – 0,05 мл стерильного физиологического раствора. Внутрикожное введение препарата Стодаль в 20% концентрации вызывало у 1-й из 6-ти свинок кожнораздражающее действие, в 1% и 10% концентрациях Стодаль не вызывал кожнораздражающего действия, поэтому в качестве разрешающей дозы для реакции

ГЗТ было выбрано в/к введение препарата в 10% концентрации.

При постановке анафилактического шока морским свинкам альбиносам вводили Стодаль по стандартной схеме в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг [5], контрольным животным вводили соответствующий объем дистиллированной воды. Учет интенсивности анафилактического шока проводили в индексах по Weigle [5]. Реакцию воспаления на Кон А проводили на мышцах самцах линии СВА. Стодаль вводили однократно перорально в дозах 1 мл/г и 1 мл/кг. Животным контрольной группы аналогичным способом вводили растворитель.

При оценке иммуноотоксических свойств стодала препарат вводили в/ж мышам линий СВА, С57BL/6 и гибридам F₁ (СВА х С57BL/6) 14 дней в дозах 1 мл/кг 10 мл/кг. Для изучения фагоцитоза перитонеальных макрофагов были использованы частицы коллоидной туши. Определение антител в реакции гемагглютинации (РПГА) к эритроцитам барана (ЭБ) выполнено на мышцах двух оппозиционно 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 препаратом Стодаль в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг при внутрисердечном (в/с) введении на 16 день опыта разрешающей дозы препарата у всех животных не вызывала симптомов системной реакции анафилаксии.

При иммунизации морских свинок препаратом в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг в смеси с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) и животных контрольной группы ПАФ, на 21-й день опыта при в/к разрешающей дозы стодала у всех животных не наблюдали аллергических реакций замедленного типа.

Однократное введение препарата Стодаль в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг мышам линии СВА не вызывало значимых изменений реакции воспаления на Кон А по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

При изучении иммуноотоксического действия препарата Стодаль на массу и клеточность лим-

Таблица 1

Влияние препарата стодаль на реакцию воспаления на Кон А

Доза препарата	Число животных в группе	Индекс реакции
Контроль Физ. раствор	10	13,0 ± 2,0
Стодаль 1 мл/кг	10	8,8 ± 1,4
Стодаль 10 мл/кг	10	11,6 ± 2,2

фоидных органов опыты проводили на мышах гибридах F₁ (СВА x C57BL/6). Двухнедельное в/ж введение препарата Стодаль в дозе 1 мл/кг приводило к достоверному увеличению массы и клеточности тимуса на 41,5 % и 20,8 %, соответственно, в дозе 10 мл/кг – массы тимуса на 20,8 % (табл. 2).

Для изучения фагоцитоза перитонеальных макрофагов были использованы частицы коллоидной туши. Результаты представлены в таблице 3, согласно которым в/ж введение препарата Стодаль мышам гибридам F₁ (СВА x C57BL/6) в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг не влияло на индекс фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.

При определении активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции в качестве источника нейтрофилов использовали гепаринизированную кровь мышей гибридов F₁ (СВА x C57BL/6), выделенную путем декапитации животных. У группы контрольных мышей уровень спонтанной хемилюминесценции суспензии нейтрофилов – I_{сп.} составлял 1,4 ± 0,3 mV. Двухнедельное введение препарата Стодаль в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг не оказывало значимого влияния на уровни спонтанной хемилюминесценции, указанные показатели составляли 1,0 ± 0,2 mV и 1,1 ± 0,2 mV, соответственно. После добавления к су-

спензии нейтрофилов зимозана в указанной ранее концентрации уровень стимулированной хемилюминесценции – ΔI у контрольных животных составил 29,5 ± 6,6 mV. Интегральный показатель хемилюминесценции – S составлял 23726,9 ± 5186,1 ед., а время достижения максимального уровня хемилюминесценции – t_{макс.} составляло 968,0 ± 48,5 секунд. При изучении кинетики хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на зимозан в контрольной и опытных группах животных выявили, что 14-дневное в/ж введение препарата Стодаль в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг не приводило к достоверному изменению параметров хемилюминесценции (табл. 4).

Влияние препарата Стодаль на гуморальный иммунный ответ изучали, используя реакцию гемагглютинации. Результаты опытов (табл. 5) свидетельствуют, что двухнедельное пероральное введение препарата Стодаль в дозах 1мл/кг и 10 мл/кг мышам линий СВА и C57BL/6 вызывало значимую стимуляцию гуморального иммунного ответа. Действие препарата Стодаль на клеточный иммунный ответ изучали по реакции гиперчувствительности замедленного типа в опытах на мышах гибридах F₁(СВАxС57BL/6). Введение препарата Стодаль

Таблица 2

Индекс масса и клеточность лимфоидных органов (% от массы тела) мышей-самцов F₁ (СВА x C57BL/6) при в/ж введении препарата Стодаль в течение 14-ти дней

Органы лимфоидной системы n=10	Контроль		Стодаль (1 мл/кг)		Стодаль (10 мл/кг)	
	Индекс массы (%)	клеточность п*10 ⁶ клеток мл*г _{органа}	Индекс массы (%)	клеточность п*10 ⁶ клеток мл*г _{органа}	Индекс массы (%)	клеточность п*10 ⁶ клеток мл*г _{органа}
Селезенка	0,416 ± 0,015	70,1±5,2	0,427 ± 0,017	71,3±3,8	0,412 ± 0,019	68,7±6,1
Тимус	0,183 ± 0,010	23,0±3,3	0,259 ± 0,018**	29,6±2,9*	0,221 ± 0,013*	28,7±4,6
Подколенные лимфоузлы	0,048 ± 0,007	4,9±0,5	0,055 ± 0,004	5,5±0,4	0,046 ± 0,005	4,5±0,6

Примечание: n – количество животных; * – p<0,05 ; ** – p<0,01 по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента

Таблица 3

Влияние препарата Стодаль на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов при в/ж введении в течение 14 дней

Доза стодаля	Фагоцитарный индекс (усл.ед.)	Уровень значимости
Контроль (n=10)	5,7 ± 1,2	
14-дневное введение в/ж 1 мл/кг (n=10)	6,1± 0,7	p>0,05
14-дневное в/ж введение 10 мл/кг (n=10)	8,6± 1,1	p>0,05

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

в дозе 1 мл/кг в течение 14 дней мышам гибридам F₁(СВАхС57BL/6 вызывало достоверное увеличение показателей клеточного иммунитета (табл. 6).

Заключение. В результате проведенного экспериментального исследования алергизирующих свойств и иммунотоксичности препарата Сто-

даль было установлено, что иммунизация препаратом в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг не вызывало у морских свинок альбиносов системной реакции анафилаксии. После иммунизации морских свинок стодалем в дозах 1мл/кг и 10 мл/кг в смеси с полным адъювантом Фрейнда у животных опытных групп не наблюдали аллергических ре-

Таблица 4

Влияние препарата Стодаль на показатели хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на зимозан

Доза стодаля	ΔI , (mv)	Уровень значимости	S, (ед.)	Уровень значимости
Контроль (n=10)	29,5 ± 6,6		23726,9 ± 5186,1	
14-дневное введение в/ж 1 мл/кг (n=10)	28,0 ± 5,4	p>0,05	29049,1 ± 3487,3	p>0,05
14-дневное в/ж введение 10 мл/кг (n=10)	17,2 ± 5,5	p>0,05	14954,9 ± 4653,7	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 препарата Стодаль на гуморальный иммунитет (РПГА) при в/ж введении препарата в течение 14-ти дней

Доза препарата стодаль	Величина иммунного ответа при антигенной нагрузке 5 x 10 ⁷ ЭБ			
	СВА		С57BL/6	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
1 мл/кг	5,9 ± 0,2 n=10	7,1 ± 0,2 n=10 p<0,01	4,5 ± 0,2 n=10	5,9 ± 0,2 n=10 p<0,05
10 мл/кг	5,9 ± 0,2 n=10	7,4 ± 0,2 n=10 p<0,01	4,5 ± 0,2 n=10	5,4 ± 0,2 n=10 p<0,05

Примечание: в таблице представлены средние величины титра антител в log₂; n – число животных в группе.

Таблица 6

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

Доза препарата	Индекс реакции: $I_p = \frac{R_{оп} - R_k}{R_k} \times 100 \%$	Уровень значимости
Контроль	48,2 ± 5,2; n=10	
1 мл/кг	62,5 ± 3,5; n=10	p<0,05
10 мл/кг	56,2 ± 3,9; n=10	

Примечание: n – число животных в группе.

акций замедленного типа. Однократное введение препарата Стодал в/ж в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг мышам линии СВА не вызывало значимых изменений по сравнению с контролем в реакции воспаления на Кон А.

Введение препарата Стодал в течение 14 дней в/ж мышам F₁ (СВА x C57BL/6) в дозе 1 мл/кг приводило к достоверному увеличению индекса массы и клеточности тимуса на 41,5 % и 28,7 %, соответственно, в дозе 10 мл/кг – массы тимуса на 20,8 %. Двухнедельное введение препарата Стодал в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг мышам линий СВА

и C57BL/6 вызывало значимую стимуляцию гуморального иммунного ответа. У мышей гибридов F₁ (СВА x C57BL/6) введение в течение 14 дней препарата Стодал в дозе 1 мл/кг вызывало достоверное увеличение показателей клеточного иммунитета.

Результаты проведенного комплексного исследования позволяют заключить, что препарат Стодал в диапазоне изученных доз не вызывает аллергических реакций немедленного и замедленного типа и псевдоаллергических реакций, стимулирует гуморальный и клеточный иммунитет и не оказывает иммунотоксического действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крепкова Л. В., Бортникова В. В., Сокольская Т. А. Некоторые аспекты токсикологического изучения лекарственных препаратов, созданных на основе лекарственного растительного сырья. *Фундаментальные исследования*. 2013. № 9-2: 256-258
2. Коройд Н. В., Заплатникова А. Л., Мингалимова Г. А., Глухарева Н. С. Внебольничные пневмонии у детей: ди-

- агностика и лечение. Трудный пациент. 2012; 10 (8): 20-25.
3. Радциг Е. Ю. Кашель – защитный механизм и симптом инфекций дыхательных путей. *Педиатрия*. 2009; 88 (5): 112-117.
4. Govekar J.P., Paul V.K., Singh K., Oberai Praveen, Roja Varanasi. Clinical evaluation of homeopathic therapy in the management of hyperlipoproteinemia. *Indian Journal of Research in Homeopathy*.

2008. 5 (2): 34-41.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по оценке алергизирующих свойств лекарственных средств Часть первая. М.: Гриф и К; 2012; 51-63.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств Методические рекомендации

- по оценке иммунотоксического действия фармакологических веществ. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012; 64-79.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств Методические рекомендации по доклиническому изучению иммунотропной активности фармакологических веществ. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012; 626-656.

REFERENCES:

1. Krepkova L.V., Bortnikova V.V., Sokol'skaya T.A. Some aspects of the toxicological studies of drug based on medicinal plants. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013. № 9-2: 256-258 (in Russian).
2. Koroid N.V., Zaplatnikova A.L., Mingalimova G.A., Glukhareva N.S. Community-acquired pneumonia in children:

- diagnosis and treatment. *Trudnyy patient*. 2012; 10 (8): 20-25. (in Russian).
3. Radtsig E.Yu. Cough – defense mechanism and a symptom of respiratory tract infections. *Pediatrya*. 2009; 88 (5): 112-117. (in Russian).
4. Govekar J.P., Paul V.K., Singh K., Oberai Praveen, Roja Varanasi. Clinical evaluation of homeopathic therapy in

- the management of hyperlipoproteinemia. *Indian Journal of Research in Homeopathy*. 2008. 5 (2): 34-41.
5. Guidelines of pre-clinical studies of drugs, 2012 year. Assessment of allergenic properties of drugs. Part 1. Moscow: Grif i K; 2012; 51-63 (in Russian).
6. Guidelines of pre-clinical studies of drugs, 2012 year. Assessment of

- immunotoxicology action of pharmacological substances. Part 1. Moscow: Grif i K; 2012; 626-656 (in Russian).
7. Guidelines of pre-clinical studies of drugs, 2012 year. Preclinical studies immunotropic activity of pharmacological agents. Part 1. Moscow: Grif i K; 2012; 626-656 (in Russian).

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

EXPERIMENTAL STUDY OF ALLERGENIC PROPERTIES AND IMMUNOTOXICITY OF THE DRUG STODAL

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

Allergenicity and immunotoxicity of Stodal preparation was assessed. Immunization of guinea pigs with Stodal in doses of 1 ml/kg and 10 ml/kg according to a standard scheme or mixed with complete Freund's adjuvant did not provoke a systemic anaphylactic reaction or delayed allergic reactions in animals. A single per os administration of the Stodal preparation in doses of 1mg/kg and 10 ml/kg to CBA line mice did not affect the inflammation response to concanavalin A (Con.A).

In F₁ (CBA x C57BL/6) mice, Stodal perorally administrated at a dose of 1 ml/mg over 14 days caused a significant increase of thymus mass index and cellularity by 41.5% and in a dose of 10 ml/kg the thymus mass increased by 28.7%. The preparation administrated in the doses of 1 ml/kg and 10 ml/kg did not affect peritoneal macrophage phagocytic activity and indicators of the neutrophils hemi-luminescent response to opsonized zymosan. A two week administration of Stodal preparation in doses of 1 ml/kg and 10 ml/kg to CBA and C57BL/6 strain mice induced a significant stimulation of the humoral immune response. In F₁ (CBA x C57BL/6) hybrid mice, 1 ml/kg dose administration induced an authentic increase of cellular immunity indicators. Thus, the Stodal preparation in the dose range investigated does not produce allergic responses of non-delayed and delayed types and pseudo-allergic reactions, stimulates humoral and cellular immunity and does not produce immune-toxic effect.

Keypasswords: *Stodal preparation, systemic anaphylactic reaction, delayed hypersensitivity, inflammation response to concanavalin A, phagocytosis, hemiluminescence, humoral immune response, cellular immune response, immunotoxicity.*

Материал поступил в редакцию 18.03.2015 г.