

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 x 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 x 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 стодала 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 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> (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 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 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 адьювантом 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 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> (СВА x C57BL/6), выделенную путем декапитации животных. У группы контрольных мышей уровень спонтанной хемилюминесценции суспензии нейтрофилов – I<sub>сп.</sub> 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<sub>макс.</sub> 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 F<sub>1</sub>(СВАxС57BL/6). Введение препарата Стодаль

Таблица 2

**Индекс масса и клеточность лимфоидных органов (% от массы тела) мышей-самцов F<sub>1</sub> (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 <sup>6</sup> клеток мл*г <sub>органа</sub>	Индекс массы (%)	клеточность п*10 <sup>6</sup> клеток мл*г <sub>органа</sub>	Индекс массы (%)	клеточность п*10 <sup>6</sup> клеток мл*г <sub>органа</sub>
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 F<sub>1</sub>(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	$\Delta I$ , (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;  $\Delta I$  – 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 <sup>7</sup> 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 log<sub>2</sub>; 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 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> (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. *Pediatriya*. 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 F<sub>1</sub> (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 hemiluminescent 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 F<sub>1</sub> (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.