

УДК 615.32:612.017

Л. Т. ТОБАГАБЫЛ, И. С. КОЛБАЙ, Г. Т. ДЖАКИБАЕВА,
А. Е. СЕЙСЕМБЕКОВ, Д. Р. РАЙЫМБЕК

ИММУНОТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ СУБСТАНЦИИ ДИКОРАСТУЩЕГО РАСТЕНИЯ ДУРНИШНИК ОБЫКНОВЕННЫЙ *XANTHIUM STRUMARIUM L.*

(РГП «Центральная лаборатория биоконтроля, сертификации и предклинических испытаний» КН МОН РК)

В экспериментах на мышах показано снижение клеточной реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) после однократного внутрибрюшинного введения субстанции *Xanthium strumarium L* в дозах 10 и 100 мг/кг. При этом наибольшее иммунотоксическое влияние субстанции в этих дозах наблюдалось на этапе разрешения реакции, при котором показана четкая зависимость от дозы. Подавление гуморального иммунитета (титров IgG и IgM антител), массы и клеточности селезенки наблюдалось только при воздействии субстанции в максимальной дозе. Выявлены цитологические повреждения клеток периферической крови при длительном введении обеих доз субстанции.

Важным этапом при испытании новых лекарственных средств, полученных химическим путем или представляющих собой растительные препараты, является определение безопасности их применения, выявление эффективных терапевтических и токсических доз. Это особенно касается лекарственных средств, рекомендуемых для лечения детских болезней, онкологических заболеваний и других патологий, требующих проведения длительных повторных курсов. В народной медицине традиционно используют препараты, полученные на основе лекарственных растений, целительные свойства которых доказаны многолетней практикой, однако не вошедшие в национальные Фармакопеи [1]. В то же время, зачастую не утаивается их возможное токсическое влияние на органы и системы организма в зависимости от дозы и длительности применения. Одним из таких лекарственных растений является дурнишник обыкновенный, представляющий собой дикорастущее однолетнее травянистое растение из семейства сложноцветных. Это растение богато содержанием йода, гликозидов, аскорбиновой кислоты, алколоидов и жирных масел, благодаря чему лекарственные средства на основе дурнишника нашли широкое применение в народной медицине при лечении таких патологий, как тиреотоксикоз, ревматизм, астма, геморрой, туберкулез, кожные, онкологические и другие заболевания [2]. В то же время отсутствуют научные данные о безопасности данного растительного сырья на организм.

Учитывая вышесказанное, целью исследования явилась оценка иммунотоксической активности субстанции дикорастущего растения дурнишник по показателям клеточного и гуморального иммунитета.

Материал и методы исследования

Оценку иммунотоксического действия субстанции дурнишника обыкновенного *Xanthium strumarium L.* проводили в экспериментах на белых беспородных мышах-самцах массой 20–25 г в соответствии с методическими указаниями, изложенными в руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [3].

Использовали минимальную терапевтическую дозу (1 ТД = 10 мг/кг) и субтоксическую дозу (10 ТД = 100 мг/кг), вводимые внутрибрюшинно однократно или перорально в течение 3-х недель.

Состояние клеточного иммунитета определяли в реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) на 40 мышах, разделенных на 5 групп (по 8 особей), включая контрольную группу. Животных иммунизировали внутрибрюшинным введением 5 %-ной суспензии эритроцитов барана (ЭБ) в объеме 0,2 мл. На 5-й день после сенсибилизации всем животным вводили разрешающую дозу ЭБ (0,1 мл 10 %-ной суспензии) в подошвенную подушечку стопы одной из задних

конечностей. В другую лапку (контрольную) в том же объеме вводили физиологический раствор. Субстанцию дурнишника вводили внутрибрюшинно, однократно, на разных стадиях клеточного иммунитета. Животным 1 и 2 групп субстанцию вводили одновременно с сенсибилизирующей дозой ЭБ, соответственно в дозах 10 и 100 мг/кг. Животным 3 и 4 групп субстанцию вводили одновременно с разрешающей дозой ЭБ, соответственно в тех же дозах. Контролем служили иммунизированные мыши, которым на 5-й день после сенсибилизации вводили разрешающую дозу антигена в подошвенную подушечку стопы с одновременным введением физиологического раствора в контралатеральную лапу в те же сроки, что и в опытных группах. Через 24 часа мышей усыпляли внутримышечным введением тиопентала натрия (3 мг/100 г массы тела), обе лапки отрезали на уровне голеностопного сустава и определяли интенсивность воспалительной реакции (ИВ) стопы по разнице массы опытной (О) и контрольной (К) лап: ИВ = О-К/К × 100%.

Состояние гуморального иммунитета определяли в экспериментах на 48 мышах и оценивали в реакции гемагглютинации, проводимой в 96-ти луночных плоскодонных планшетах. Мышей сенсибилизовали внутрибрюшинным введением 0,2 мл суспензии ЭБ в концентрации 5·10⁶/мл и делили на 4 опытные группы (I – IV) и две контрольные группы по 8 мышей в каждой. Для исследования влияния субстанции дурнишника на индуктивную fazу гуморального иммунного ответа (IgM-ответа) животным I-й и II-й групп одновременно с антигеном вводили субстанцию в дозах, соответственно 10 и 100 мг/кг. Определение титра антител в реакции гемагглютинации проводили на 4-е сутки после иммунизации на пике синтеза IgM. Животным III-й и IV-й групп субстанцию в дозах соответственно 10 и 100 мг/кг, вводили на 5-е сутки после иммунизации на продуктивной fazе гуморального иммунного ответа (IgG-ответа), а титр антител определяли на 7-е сутки на пике синтеза IgG. Контрольным мышам внутрибрюшинно вводили дистиллированную воду. Одновременно с титрами антител у всех животных проводили анализ периферической крови на содержание форменных элементов на автоматическом гематологическом анализаторе КХ-21 и также определяли массу селезенки в мг. Для каждого дня был свой контроль – иммуни-

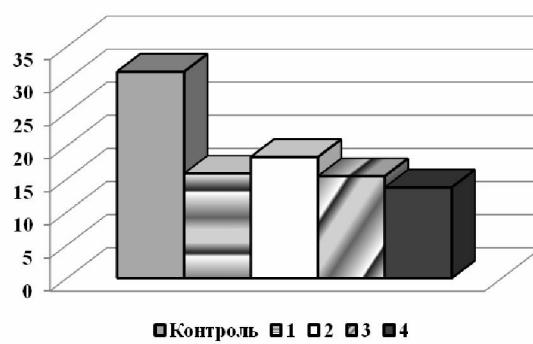
зированные мыши, которым внутрибрюшинно вводили дистиллированную воду.

Исследовали пролиферативные процессы селезенки после многократного перорального введения мышам (в течение трех недель) субстанции дурнишника в дозах 10 и 100 мг/кг. В клеточных суспензиях селезенки, приготовленных из расчета 50 мг массы органа на 1 мл физиологического раствора, подсчитывали количество ядросодержащих клеток (ЯСК) в камере Горяева, количество которых выражали в абсолютных единицах в органе и в относительных значениях по отношению к массе органа. Из периферической крови этих животных готовили мазки на предметных стеклах, окрашивали азурэозином по Романовскому-Гимзе и микроскопировали с целью выявления цитологических изменений клеток крови и их количественного соотношения под воздействием дурнишника.

Результаты опытов обработаны и сравнены между исследуемыми группами статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

В экспериментах по изучению состояния клеточного иммунитета в РГЗТ показано, что у всех опытных животных независимо от дозы и времени введения дурнишника наблюдалось подавление клеточной РГЗТ по сравнению с контрольными иммунизированными мышами ($p < 0,001$), что отражено на рисунке. Наибольшее снижение показателя ИВ (более чем 2 раза) наблюдалось при введении субстанции в концентрации 100 мг/кг на второй стадии развития РГЗТ.



Влияние субстанции дурнишника на формирование РГЗТ при однократном внутрибрюшинном введении на разных этапах иммунного ответа

Полученные результаты позволяют судить о токсическом влиянии дурнишника на Т-клеточный иммунитет, проявляющийся как в подавлении образования сенсибилизованных лимфоцитов (Т-эффекторов) на введенный антиген, так и в

снижении реакции взаимодействия их с антигеном. Данные изменения сопровождались достоверным снижением массы селезенки у животных, подвергавшихся воздействию дурнишника в дозе 100 мг/кг ($p < 0,05$), что отражено в табл. 1.

Таблица 1. Влияние субстанции дурнишника на массу селезенки и лейкопоэз

Серии опытов	Масса селезенки, г	Количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	Количество лимфоцитов, $\times 10^9/\text{л}$
1	178 \pm 8	21,8 \pm 4,1**	14,3 \pm 3,4 **
2	141 \pm 7*	11,7 \pm 5,3	7,5 \pm 2,3
3	186 \pm 8	8,5 \pm 3,6	5,8 \pm 3,5
4	152 \pm 8*	9,2 \pm 2,8	6,4 \pm 2,4
Контроль	182 \pm 11	13,1 \pm 4,2	9,0 \pm 2,6

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Количество лейкоцитов и абсолютное содержание лимфоцитов в периферической крови при воздействии дурнишником в дозе 10 мг/кг на стадии сенсибилизации организма повышалось по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,001$). Введение субстанции в обеих дозах на этапе разрешения реакции сопровождалось тенденцией к снижению этих показателей.

В табл. 2 представлены данные по состоянию гуморального иммунитета (титры антител)

после однократного воздействия субстанции в двух указанных выше дозах в день иммунизации мышей и на 5-е сутки после иммунизации. Исследование, проведенное соответственно на 4-е и 7-е сутки после иммунизации мышей, показало тенденцию к снижению титров антител как IgM, так и IgG при воздействии дурнишником в дозе 10 мг/кг и достоверное снижение при воздействии субстанции в дозе 100 мг/кг ($p < 0,001$).

Таблица 2. Иммунотоксическое влияние субстанции дурнишника при его введении в разные сроки иммунного ответа иммунизированных мышей

Показатели иммунного ответа	Контроль иммунизация + вода дистиллированная		Введение субстанции одновременно с иммунизацией, исследование на 4-е сутки концентрация субстанции, мг/кг		Введение субстанции на 5-е сутки после иммунизации, исследование на 7-е сутки концентрация субстанции, мг/кг	
	4-й	7-й	10	100	10	100
Титры IgM в РПГА	0,9 \pm 0,06		0,5 \pm 0,03	0,1 \pm 0,02***		
Титры IgG в РПГА		1,4 \pm 0,07			1,1 \pm 0,12	0,5 \pm 0,02***
Количество тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	385 \pm 55,4	381,7 \pm 39,7	381 \pm 46,8	336,3 \pm 39,7	296,3 \pm 40,2	140 \pm 26,8***
Масса селезенки, мг	172 \pm 37,8	142 \pm 24,6	167 \pm 57,8	175 \pm 43,8	172 \pm 46,9	118 \pm 21,7***

*** $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Одновременно проведенное гематологическое исследование показало изменение количества в крови тромбоцитов в абсолютных значениях у мышей, подвергавшихся воздействию субстанции в концентрации 100 мг/кг на 5-е сутки после иммунизации ($p < 0,001$). У этих мышей также наблюдалось снижение массы селезенки ($p < 0,001$).

Воздействие субстанции дурнишника пер ос в дозе 100 мг/кг в течение двух месяцев приводило к снижению массы и клеточности селезенки по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Однако отмечено, что при достаточно высокой массе органа у индивидуальных особей в опытной группе, превышающей среднее значение в контроле, пролиферативные процессы в селезенке

Таблица 3. Показатели массы и клеточности селезенки
после многократного воздействия субстанции дурнишника

Исследуемые группы	Масса селезенки, мг	Количество ЯСК по отношению к массе органа, %	Количество ЯСК, $\times 10^6$ в селезенке	Количество ЯСК, $\times 10^6$ в 1 мг селезенки
10 мг/кг	70±9	0,6±0,1	64,3±15,8	5,3±2,1
100 мг/кг	62±8*	0,3±0,2	57,8±14,9	3,3±1,5**
Контроль	89±9	0,7±0,1	61,1±12,8	6,8±2,3

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

подавлены, т.е. внутри опытной группы прямой зависимости между клеточностью органа и ее массой не обнаружено. Поэтому, как видно из таблицы, наиболее информативным являются значения показателей, выраженные в абсолютных значениях на 1 мг массы органа. Из экспериментальных работ других исследователей, изучавших активные иммуностимулирующие препараты, показано повышение после их воздействия количества ЯСК и увеличение массы органов иммуногенеза [2]. Следовательно, наши данные позволяют сделать заключение об иммунодепрессирующем влиянии субстанции дурнишника в субтоксической дозе.

Цитологические исследования клеток крови после многократного воздействия субстанции позволили обнаружить в опытных группах животных повреждения мембранны клеток, в некоторых случаях с образованием, так называемых, бле-бингов. Встречались двуядерные лимфоциты и нейтрофилы, что не наблюдалось в контрольной группе животных.

В результатах исследований видно различие влияния разных концентраций субстанции на иммунологическую реактивность организма животных при однократном воздействии, что согласуется с литературными данными [4, 5]. Однако многократное воздействие низкой дозы субстанции дурнишника приводило к таким же цитологическим повреждениям клеток крови, что и субтоксическая доза. Тем не менее, полученные результаты не позволяют делать заключение о токсическом влиянии концентрации субстанции 10 мг/кг, поскольку снижение массы органа иммуногенеза и подавление пролиферации иммуно-компетентных клеток, являющейся основным этапом эффекторной реакции, не наблюдалось как при однократном, так и многократном воздействии. Наряду с этим подавление клеточного иммунитета в РГЗТ может быть временными,

учитывая сохранение нормального гуморального ответа при воздействии этой дозы и высокий компенсаторный потенциал иммунной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Астана: Жибек жолы, 2008. 591 с.
2. http://www.travakavkaza.ru/index.php?script=show_art&art_id=24&
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2000. 398 с
4. Тюренков И.Н., Самотруева М.А. Сравнительное изучение иммунокорригирующей активности Фенибута и его органических солей при экспериментальном иммунодефиците // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2009. Т. 147, № 5. С. 536-539.
5. Тюренков И.Н., Галимзянов Х.М., Теплый Д.Л. и др. Экспериментальное изучение иммунокорригирующих свойств Фенотропина в аспекте «доза-эффект» // Иммунология. 2009. № 5. С. 302-305.

Резюме

Xanthium strumarium L. субстанциясын тышкандаңға 10 және 100 мг/кг бірғанда қолданғанда клеткалық реакциясының баяу түрінің төмендеуі көрсетілген. Және де осы мөлшердегі реакция шамасы иммундық уыттылықтың толыққанды тәуелсіздігі байкалған. Гуморалды иммунитеттің және антибелипектері басылуы олардың массалық және көкбауыр клеткалығындағы дурнишник субстанциясының 100 мг/кг мөлшерінде байқалған. Жасушалардың цитологиялық бұзылуы алшақ қан айналымында осы субстанциясының көп мөлшерде және бірнеше рет қолданғанда айқындалған.

Summary

The decrease in cell reaction of hyper-sensitivity of slowing type after an injection of the substance of Xanthium strumarium L. in the doses of 10 and 100 mg/kg are shown in the experiments on mouse. Maximal dose-depend immune toxical effect of the substance was seen at the stage of the reaction solution. Suppression of the humoral immunity (IgG and IgM antibodies titres), mass and cells content of spleen were registered only effect of Xanthium strumarium substance in dose 100 mg/kg. The cytological damage of blood cells at chronic effect of both doses of substance were revealed.