

## ІМУНОМОДЕЛЮЮЧА АКТИВНІСТЬ ВІСМУТУ ЦИТРАТУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

О. І. Грушка<sup>1</sup>, В. А. Туркіна<sup>2</sup>, Б. П. Кузьмінов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ЦНДЛ та лабораторії промислової токсикології «Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького», м. Львів, Україна

<sup>2</sup>Лабораторія санітарної токсикології НДІ гігієни і епідеміології «Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького», м. Львів, Україна

<sup>3</sup>НДІ гігієни і епідеміології «Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького», м. Львів, Україна

### Резюме

**Мета роботи.** Дослідити в експериментальних умовах вплив вісмуту цитрату на імунну систему лабораторних тварин.

**Матеріали і методи.** Однократну сенсibilізацію мурчаків (підшкірно у вушко) проводили за методом О.Г. Алексєєвої, А.І. Петкевич. Ступінь сенсibilізації встановлювали після постановки шкірних проб. Визначали лейкоцитарну формулу крові, Т і В лімфоцити в периферичній крові методом розеткоутворення, імуноглобуліни класу А, М, G в сироватці крові – методом радіальної імунодифузії глобулінів в агарі Діфко, циркулюючі імунні комплекси – методом преципітації великоглобулярних імунних комплексів крові з високомолекулярним поліетиленгліколем, спектрофотометрично, виявлення реакції клітин крові на алерген «in vitro» – за реакцією специфічного лізису лейкоцитів.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Вісмут цитрат викликає порушення імунологічного гомеостазу у експериментальних тварин. Показники неспецифічного клітинного компоненту імунної системи суттєво змінилися, що характеризує імунокомплексну патологію. Відмічено зниження Т-хелперної субпопуляції, що свідчить про суттєву імуномодельючу здатність вісмуту цитрату. Водночас відмічено суттєве підвищення клітин здатних до розеткоутворення, що дає підставу стверджувати, що вісмут цитрат здатен провокувати сенсibilізацію організму. В гуморальній ланці імунітету відмічено вірогідні відмінності вмісту циркулюючих імунних комплексів у сенсibilізованих та контрольних тварин. Рівні імуноглобулінів не змінені відносно контролю. Аналіз сенсibilізуючого ефекту вказує на те, що найбільш імовірним результатом сенсibilізації організму при даному режимі надходження вісмуту цитрату є формування гіперчутливості III типу.

**Висновки.** Вісмут цитрат в експериментальних умовах викликає зміни в імунній системі піддослідних тварин, які характерні для алергенної відповіді організму по комплементзалежному типу.

**Ключові слова:** вісмуту цитрат, імунний гомеостаз, лабораторні тварини

### ВСТУП

Сполуки вісмуту використовуються в медицині понад 200 років, на даний час основне застосування цих сполук сфокусовано на їх антимікробній активності та захисті травного тракту. Один з сучасних зареєстрованих фармацевтичних препаратів на основі вісмуту – це колоцидний субцитрат вісмуту (CBS), який є діючою речовиною препаратів Де-Нол, Трибімол, Пілорид і Телен. Окрім того, кристалічна сіль вісмуту та лимонної кислоти має практичне застосування як складова косметичних виробів в якості колірної добавки в фарбах для волосся [9].

Не дивлячись на статус важкого металу, вісмут та його сполуки вважаються нетоксичними. Ймовірно, це пояснюється їх нерозчинністю в нейтральних водних розчинах та біологічних рідинах та дуже низькою біодоступністю [8]. Водночас багато аспектів впливу даних сполук на організм, наприклад такий, як можливий субклінічний побічний ефект все ще досліджуються. Зазначається, що терапевтична ефективність сполук вісмуту не зменшує актуальності дослідження фармакології та токсикології цих препаратів. Зокрема, у доступній літературі нами не знайдено інформації щодо впливу вісмуту цитрату на імунну систему.

**Мета роботи** – дослідити в експериментальних умовах вплив вісмуту цитрату на імунну систему лабораторних тварин.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експериментальна робота проведена на 20 морських свинках масою тіла 300-350 г. Експериментальні тварини отримували стандартний гранульований корм з необмеженим доступом до питної води. Під час проведення досліджень дотримувались принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» [6] та «Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» [3].

Методом «сліпого ранжування» тварини були поділені на дві групи по 10 особин в кожній: дослідна та контрольна.

Вісмут цитрат за зовнішнім виглядом – це білий аморфний порошок, який слабо розчиняється у воді та спиртах, та добре – у 25% розчині аміаку та азотної кислоти. Хімічна назва за IUPAC – вісмут;2-гідроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат.

Однократну сенсibilізацію мурчаків (підшкірно у вушко) проводили за методом О. Г. Алексеевої, А. І. Петкевич [4]. Ступінь сенсibilізації встановлювали після постановки шкірних проб. Реакцію організму оцінювали шляхом візуального огляду поверхні шкіри на місці введення проб через 20-30 хв., 4-5 год та 24 год. після введення і за результатами клінічних та імунологічних тестів. Контрольним тваринам вводили розчинник (фізіологічний розчин).

Визначали зміни показників периферичної крові. На основі лейкоцитарної формули проводили обчислення співвідношення окремих популяцій лейкоцитів. Виразували гематологічні індекси: індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ІСЛМ), індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів (ІСНМ), індекс співвідношення нейтрофілів та еозинофілів (ІСНЕ) [2].

Для визначення Т і В лімфоцитів в периферичній крові використовували метод розеткоутворення, імуноглобуліни класу А, М, G в сироватці крові визначали методом радіальної імунодифузії глобулінів в агарі Діфко [2].

Циркулюючі імунні комплекси (ЦК) визначали методом преципітації великоглобулярних імунних комплексів крові з високомолекулярним поліетиленгліколем, спектрофотометрично [1].

Для кількісної оцінки сенсibilізації використовували метод з виявлення реакції клітин крові на алер-

ген «in vitro» – реакцію специфічного лізису лейкоцитів (РСЛЛ). Даний тест дає можливість виявити алергічну реакцію сповільненого типу, яка викликана сенсibilізацією клітин.

Для постановки РСЛЛ в пробірку вносили по 0,05 мл фізіологічного розчину: в контрольну пробірку – фізіологічний розчин, в дослідну – фізіологічний розчин з вісмут цитратом. Потім в пробірку додавали по 0,1 мл крові піддослідних тварин і інкубували їх при температурі 37 °С упродовж 2 годин. Після цього отриманий розчин переносили по 0,02 мл в лунки планшета, якій містив по 0,4 мл рідини Тюрка. Підраховували абсолютну кількість лейкоцитів та розраховували показник за формулою:

$РСЛЛ = (Лк-Лд) / Лк * 100$ , де Л-абсолютна кількість лейкоцитів в контролі (К) та досліді (Д).

Реакція вважалась позитивною тільки при показнику більше або рівному 10%.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету програми Microsoft Excel. Перевірку відповідності отриманих даних нормальному закону розподілу проводили за критерієм Колмогорова-Смірнова. Параметричні дані описані середніми значеннями (М) і стандартними відхиленнями (SD). За умови відповідності нормальності розподілу достовірність отриманих відмінностей порівнюваних величин оцінювали з використанням t-критерію Стюдента. За достовірні приймали зміни з рівнем значимості більш, ніж 95% ( $p < 0,05$ ) [7].

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вісмут цитрат в умовах даного експерименту не впливає на загальний вміст лейкоцитів у крові піддослідних тварин порівняно із контрольною групою. Аналіз лейкоформули виявив дестабілізаційну дію препарату на функціональний стан крові, яка проявилась збільшенням абсолютного числа еозинофілів та абсолютного і відносного числа моноцитів з одночасним зменшенням відносного числа нейтрофілів, вираженим лімфоцитозом на тлі відсутності змін відносних та абсолютних кількісних показників інших субпопуляцій лейкоцитів (табл. 1). Опосередковано дана картина може характеризувати імунокомплексну патологію. Окрім того, загальновизнано, що передумовою для підвищення кількісних характеристик моноцитів та еозинофілів зазвичай є алергічні реакції. Аналіз гематологічних індексів показує зниження ІСНМ, що свідчить про зсув рівноваги компонентів мікрофагально-макрофагальної системи та зниження ІСЛМ, що вказує на порушення афекторної ланки імунної відповіді. Виявлена у піддослідних тварин картина лейкоформули свідчить про зрушення імунологічного гомеостазу.

Таблиця 1

## Показники периферичної крові мурчаків після сенсibilізації вісмутом лимоннокислим (n=10, t критичне=2,1)

Показники	Контроль	Дослід
Лейкоцити, $\times 10^9$	6,10 $\pm$ 1,80	6,97 $\pm$ 1,58
Лейкоформула:		
Базофіли, %	1,20 $\pm$ 0,79	1,55 $\pm$ 0,82
Базофіли, Г/л	0,075 $\pm$ 0,054	0,104 $\pm$ 0,058
Еозинофіли, %	2,40 $\pm$ 0,70	2,60 $\pm$ 0,84
Еозинофіли, Г/л	0,141 $\pm$ 0,045	0,187 $\pm$ 0,075*
Нейтрофіли, %	37,40 $\pm$ 3,84	30,80 $\pm$ 5,41*
Нейтрофіли, Г/л	2,27 $\pm$ 0,76	2,12 $\pm$ 0,475
Моноцити, %	1,70 $\pm$ 0,48	35 $\pm$ 1,65*
Моноцити, Г/л	0,104 $\pm$ 0,0487	0,253 $\pm$ 0,146*
Лімфоцити, %	57,30 $\pm$ 4,45	61,50 $\pm$ 3,92*
Лімфоцити, Г/л	3,46 $\pm$ 1,034	4,30 $\pm$ 1,11
Гематологічні індекси:		
ІСЛМ	37,42 $\pm$ 14,69	20,5 $\pm$ 7,78*
ІСНМ	23,94 $\pm$ 9,46	11,00 $\pm$ 6,02*
ІСНЕ	17,44 $\pm$ 8,15	12,31 $\pm$ 3,95

\* достовірні зміни (p&lt;0,05)

При аналізі показників клітинної ланки системного імунітету встановлено, що величини відносної кількості загального пулу Т-лімфоцитів значимо менша порівняно із контрольними показниками

(табл. 2) за рахунок зниження Т-хелперної субпопуляції (табл. 2). Таке пригнічення клітинної ланки імунітету свідчить про суттєву імуномодельюючу здатність вісмуту цитрату.

Таблиця 2

## Показники клітинного імунітету в мурчаків, сенсibilізованих вісмутом лимоннокислим (n=10, t критичне=2,1)

Назва показників	Сенсibilізовані тварини	Контрольні тварини
Т-лімфоцити, %	40,60 $\pm$ 2,67*	45,70 $\pm$ 3,83
Т-лімфоцити, Г/л	1,75 $\pm$ 0,50	1,57 $\pm$ 0,46
Т-хелпери, %	24,60 $\pm$ 4,11*	29,30 $\pm$ 2,95
Т-хелпери, Г/л	0,432 $\pm$ 0,14	0,456 $\pm$ 0,131
Т-супресори, %	16,00 $\pm$ 4,32	16,40 $\pm$ 4,00
Т-супресори, Г/л	0,284 $\pm$ 0,128	0,262 $\pm$ 0,108
Т-активні, %	33,90 $\pm$ 8,21	28,00 $\pm$ 4,30
Т-активні, Г/л	1,513 $\pm$ 0,679*	0,944 $\pm$ 0,232
О-лімфоцити, %	45,60 $\pm$ 4,06*	37,30 $\pm$ 3,95
О-лімфоцити, Г/л	1,946 $\pm$ 0,48*	1,294 $\pm$ 0,40
В-лімфоцити, %	9,30 $\pm$ 2,36*	14,10 $\pm$ 2,64
В-лімфоцити, Г/л	0,407 $\pm$ 0,175	0,498 $\pm$ 0,191
ІРІ (імунорегул.індекс)	1,695 $\pm$ 0,712	1,89 $\pm$ 0,514
Індекси:		
ЛТІ	4,06 $\pm$ 0,50	3,87 $\pm$ 0,344
ЛВІ	18,54 $\pm$ 4,35*	12,81 $\pm$ 2,65
Гуморальний імунітет:		
ЦККи, ум.од.	133,90 $\pm$ 41,13*	47,30 $\pm$ 8,60
IgA, г/л	0,43 $\pm$ 0,06	0,54 $\pm$ 0,14
IgM, г/л	0,54 $\pm$ 0,09	0,68 $\pm$ 0,18
IgG, г/л	1,21 $\pm$ 0,19	1,85 $\pm$ 0,47

\* достовірні зміни (p&lt;0,05).

Водночас відмічено суттєве підвищення клітин здатних до розеткоутворення, що є свідченням того, що вісмут цитрат здатен провокувати сенсibiliзацію організму.

Значення лейко-В-клітинного індексу у сенсibiliзованих тварин зросло порівняно з контролем на 44%, що є відображенням дисбалансу у системі Т- і В-лімфоцитів і є підставою для твердження про недостатність В-залежної ланки імунної системи.

В гуморальній ланці імунітету відмічено вірогідні відмінності вмісту циркулюючих імунних комплексів у сенсibiliзованих та контрольних тварин (табл. 2). Це вказує на розвиток у сенсibiliзованих тварин алергічної реакції III-го типу.

Імовірно через те, що патологічні процеси проходять по Ig-незалежному шляху, рівні імуноглобулінів не змінені відносно контролю.

Результати отримані у тесті РСЛЛ не виявили достовірних відмінностей у показниках лейколізису дослідної та контрольної групи тварин. Перевищення

його критичного значення у 10% не спостерігається ні у піддослідних тварин, ні в контролі і коливалися в межах від 0 до 8%.

## ВИСНОВКИ

В умовах експериментального впливу вісмут цитрат викликає порушення імунологічного гомеостазу у дослідних тварин. Показники неспецифічного клітинного компоненту імунної системи суттєво змінилися, що відображає системні процеси, які відбуваються в цілому організмі. Аналіз сенсibiliзуючого ефекту вказує на те, що найбільш імовірним результатом сенсibiliзації організму при даному режимі надходження вісмуту цитрату є формування гіперчутливості III типу.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи важливу роль імунної системи у збереженні рівноваги в організмі та ризик виникнення патологічних станів при її порушенні, важливим є розробка регламенту вісмуту цитрату в середовищі існування людини.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гриневиц Ю. А., Алферов А. Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. Лабораторное дело. 1981. № 8. С. 493-495.
2. Трахтенберг І. М., Дмитруха Н. М., Моложава О. С., Миронюк Ю. М. Порушення імунного статусу організму людини за дії хімічних чинників та методи їх визначення: метод. рекомендації. К., 2007. 48 с.
3. Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах: Наказ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України від 01.03.2012 № 249. Офіційний вісник України. 2012. № 24. С. 82.
4. Алексеева О. Г., Дуева Л. А. Аллергия к промышленным химическим соединениям. М.: Медицина 1978. 272 с.
5. Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны: методические рекомендации № 2121-80: Утв. Заместитель Главного государственного санитарного врача СССР от 23.01.1980. Минздрав ЛатвССР. 19 с.
6. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes 18.III.1986. European Treaty Series No. 123. URL: [www.conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm](http://www.conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm)(accessed on 11 April 2005).
7. Glantz S. A., Bryan K. S. Primer of Applied Regression and Analysis of Variance. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 1990. 992 p.
8. Salvador J. A., Figueiredo S. A., Pinto R. M., Silvestre S. M. Bismuth compounds in medicinal chemistry. Future Med Chem. 2012. Vol. 4, № 11. P. 1495-1523.
9. Udalova T.A., Logutenko O. A., Timakova E. V., Afonina L. I., Naydenko E. S., Yukhin Y. M. Bismuth compounds in medicine. Third International Forum on Strategic Technologies (Novosibirsk-Tomsk, June 23-29, 2008). Tomsk, 2008. P. 137-140.

## REFERENCES

1. Hrynevych, YU.A., Alferov, A.N. (1981). Opredelenye ymmunnykh kompleksom v krovy onkologicheskikh bolnykh [Determination of immune complex in blood of cancer patients]. Laboratory Case, 8, 493-495.
2. Trakhtenberh, I.M., Dmytrukha, N.M., Molozhava, O.S., Myronyuk YU.M. (2007). Porushennya imunnogo statusu orhanizmu lyudyny za diyi khimichnykh chynnykiv ta metody yikh vyznachennya: Metod.

- Rekomendatsiyi [Violation of the immune status of the human body by the action of chemical factors and methods for their determination: Method. Recommendations]. K., 48 p.
3. Poryadok provedennya naukovy my ustanovamy doslidiv, eksperymentiv na tvarynakh: Nakaz Ministerstva osvity, nauky, molodi ta sportu Ukrainy vid 01.03.2012 № 249. [Procedure for carrying out experiments, experiments on animals by scientific institutions: Order of the Ministry of Education, Science, Youth and Sports of Ukraine No. 249 of 01.03.2012]. (2012).
  4. Alekseyeva, O.G., Duyeva, L.A. (1978). Allergiya k promyshlennym khimicheskim soyedineniyam [Allergy to industrial chemical compounds]. M.: Meditsina.
  5. Metodicheskiye rekomendatsii № 2121-80 Postanovka issledovaniy po gigiyenicheskomu normirovaniyu promyshlennykh allergenov v vozdukhe rabochey zony: Utv. Zamestitel' Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha CCCR ot 23.01.1980. [Methodical recommendations No. 2121-80 Research design for hygienic regulation of industrial allergens in the air of the working area: Approved. Deputy Chief State Sanitary Doctor of the USSR CCR dated 01/23/1980.] (1980).
  6. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (1986). Available at: <http://www.conventions.coe.int/treaty/en/treaties/html/123.htm>.
  7. Glantz S. A., Bryan K. S. (1990). Primer of Applied Regression and Analysis of Variance. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
  8. Salvador J. A., Figueiredo S. A., Pinto R. M., Silvestre S. M. (2012). Bismuth compounds in medicinal chemistry. Future Med Chem., 4, 11, 1495-1523.
  9. Udalova T. A., Logutenko O. A., Timakova E. V., Afonina L. I., Naydenko E. S., Yukhin, Y. M. (2008). Bismuth compounds in medicine. Third International Forum on Strategic Technologies. Tomsk.

## Резюме

### ИММУНОМОДЕЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ВИСМУТА ЦИТРАТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

О. И. Грушка, В. А. Туркина, Б. П. Кузьминов

«Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого», г. Львов, Украина

**Цель работы.** Исследовать в экспериментальных условиях влияние висмута цитрата на иммунную систему лабораторных животных.

**Материалы и методы.** Однократную сенсibilизацию морских свинок (подкожно в ухо) проводили по методу О.Г. Алексеевой, А.И. Петкевич. Степень сенсibilизации определяли после постановки кожных проб. Исследовали лейкоцитарную формулу крови, количество Т и В лимфоцитов в периферической крови методом розеткообразования, содержание иммуноглобулинов классов А, М, G в сыворотке крови – методом радиальной иммунодиффузии глобулинов в агаре Дифко и циркулирующих иммунных комплексов – методом преципитации высокоглобулярных иммунных комплексов крови с высокомолекулярным полиэтиленгликолем, спектрофотометрически, выявление реакции клеток крови на аллерген «in vitro» – по реакции специфического лизиса лейкоцитов.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Висмут цитрат вызывает нарушение иммунологического гомеостаза у экспериментальных животных. Показатели неспецифического клеточного компонента иммунной системы существенно изменились, что характеризует иммунокомплексную патологию. Отмечено снижение Т-хелперной субпопуляции, что свидетельствует о иммуномодулирующей способности висмута цитрата. В то же время отмечено существенное повышение количества клеток, способных к розеткообразованию, что дает основание утверждать, что висмут цитрат способен провоцировать сенсibilизацию организма. В гуморальном звене иммунитета отмечено достоверные различия содержания циркулирующих иммунных комплексов в сенсibilизированных и контрольных животных. Уровни иммуноглобулинов не изменены относительно контроля. Анализ сенсibilизирующего эффекта указывает на то, что наиболее вероятным результатом сенсibilизации организма при данном режиме поступления висмута цитрата является формирование гиперчувствительности III типа.

**Выводы.** Висмут цитрат в экспериментальных условиях вызывает изменения в иммунной системе подопытных животных, что характерно для аллергенного ответа организма по комплементзависимому типу.

**Ключевые слова:** висмут цитрат, иммунный гомеостаз, лабораторные животные

## Summary

### THE IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF BISMUTH CITRATE IN EXPERIMENT

O. Hrushka, V. Turkina, B. Kuzminov

«Danylo Halytsky Lviv National Medical University», Lviv, Ukraine

**Aim.** The research in the experimental conditions of effect bismuth citrate on the immune system of laboratory animals.

**Materials and methods.** The sensitization of tadpoles (subcutaneously into the ear) was conducted according to the method of O.G. Alekseeva, A.I. Petkevich. The degree of sensitization was established after skin tests. Examined the leucocyte blood formula, T and B lymphocytes in peripheral blood by the rosetting method, keeping immunoglobulins of class A, M, G in the blood serum – by the method of the radial immunodiffusion of globulines in agar Difco circulated complexes detection of the response of blood cells to the allergen «in vitro» – by the reaction of specific leukocyte lysis.

**Results.** The bismuth citrate causes impaired immunological homeostasis in experimental animals. The indicators of nonspecific cellular component of the immune system have changed significantly, characterizing immunocomplex pathology. A decrease in the T-helper subpopulation was observed, indicating a significant immunomodulatory ability of bismuth citrate. At the same time, there was a significant increase in cells capable of rosetting formation, which suggests that bismuth citrate is capable of provoking sensitization of the body's system. In the humoral immunity link, significant differences in the content of circulating immune complexes in sensitized and control animals were observed. The immunoglobulin levels were unchanged relative to control. The analysis of the sensitizing effect indicates that the most probable result of sensitization of the organism in this mode of receipt of bismuth citrate is the formation of the type of hypersensitivity III.

**Conclusions.** The bismuth citrate under experimental conditions causes changes in the immune system of experimental animals, which are characteristic of the allergenic response of the organism to the complement-dependent type.

**Key words:** bismuth citrate, immune homeostasis, laboratory animals

Інформація про авторів знаходиться на сайті <http://www.cp-medical.com>.

Дата надходження до редакції – 1.08.2019