

# ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИПОКСЕНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

УДК 615.25

© Л. К. Хныченко, И. В. Окуневич

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

## Ключевые слова:

воспаление; гипоксен; симвастатин; ибупрофен.

## Резюме

Воспаление относится к типовым патологическим процессам и рассматривается как «мишень» для воздействия лекарственных средств. Известно, что активированные метаболиты кислорода и другие радикалы участвуют в патогенезе воспаления и развитии его основных стадий. Представляет интерес исследовать потенциальное противовоспалительное действие у гипоксена — натриевой соли поли (п-диокси-о-фенилен) тиосерной кислоты. Полигидрофениленовая структура гипоксена обеспечивает проявление выраженных антиоксидантных свойств, способность связывать большое число свободных радикалов, нейтрализовывать окислители и продукты перекисного окисления липидов. В моделях острого экссудативного (каррагинин-индуцированного) и хронического пролиферативного (гранулематозного) воспаления выявлена выраженная противовоспалительная активность антигипоксанта гипоксена (50 мг/кг, перорально), сопоставимая с таковой у нестероидного противовоспалительного средства ибупрофена (80 мг/кг) и гиполипидемического препарата симвастатина (40 мг/кг). Полученные результаты расширяют наши представления о фармакологических свойствах гипоксена и обосновывают применение этого антигипоксанта, проявляющего выраженное гиполипидемическое действие, в комплексной терапии пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, сопровождающимися воспалением.

## ВВЕДЕНИЕ

Воспаление относится к типовым патологическим процессам и является сложной многокомпонентной реакцией организма на повреждение [5]. К настоящему времени накоплено множество клинических и экспериментальных данных, указывающих на участие активированных метаболитов кислорода и других радикалов в патогенезе воспаления и развитии его основных стадий [3, 17]. В связи с этим представляет интерес исследовать потенциальное противовоспалительное действие у препаратов, проявляющих антиоксидантные свойства. Наше внимание привлек гипоксен — натриевая соль поли (п-диокси-о-фенилен) тиосерной кислоты [11]. Известно, что полигидрофениленовая структура гипоксена обеспечивает проявление выраженных антиоксидантных свойств,

способность связывать большое число свободных радикалов, нейтрализовывать окислители и продукты перекисного окисления липидов [6, 7, 13].

Цель настоящей работы — оценить влияние гипоксена на острое экссудативное и хроническое пролиферативное воспаление в эксперименте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 500 нелинейных самцах крыс (130–150 г) и 250 самцах мышей (18–20 г), содержащихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях.

Гипоксен (50 мг/кг, субстанция, «Диод», Россия) и препараты сравнения: ибупрофен — нестероидное противовоспалительное средство с выраженной антифлогистической активностью (80 мг/кг, «Татхим-фармпрепараты», Россия); симвастатин (40 мг/кг, «Зокор», Нидерланды) вводили в желудок через зонд. Симвастатин, помимо антиоксидантной активности, проявляет противовоспалительное действие, подавляя асептическое воспаление атероматозных бляшек и прилегающей интимы артерий [1, 9, 15].

Противовоспалительную активность оценивали на скрининговой модели экссудативного воспаления и хронической модели гранулематозного воспаления [8]. Острое экссудативное воспаление вызывали субплантарным введением 0,1 мл 1% раствора каррагинина (Sigma, США) в правую заднюю конечность экспериментальных животных (мыши, крысы). Воспалительную реакцию оценивали через 3 часа после индукции воспаления по изменению объема лапы. Процент угнетения отека рассчитывали по формуле:  $\% = (V_o / V_k - 1) \times 100$ , где  $V_o$  — разность между начальным объемом конечности и ее объемом во время замера в экспериментальной группе;  $V_k$  — аналогичная разность в контрольной группе. Гипоксен вводили за 1 час до каррагинина. Контрольные животные получали физиологический раствор в таком же объеме.

Хроническое гранулематозное воспаление (асептическое субхроническое) моделировали имплантацией под кожу спины животных стерильного ватного шарика («ватная гранулема») массой 40 мг [8]. Операцию проводили под эфирным наркозом.

Гипоксен и препараты сравнения вводили предварительно за 1 час до имплантации ватного шарика и в течение последующих 12 дней. После декапитации животных (на 13-е сутки эксперимента) собирали периферическую кровь и отделяли имплантированный ватный шарик вместе с образовавшейся вокруг него гранулемной тканью. Массу гранулемы измеряли непосредственно после выделения, а затем после ее высушивания ( $t = 70^\circ\text{C}$  в течение суток). О процессах экссудации судили по разнице между массой исходной (свежевыделенной) и высушенной гранулемы; о пролиферации — по разнице между массой высушенной гранулемы и исходной массой имплантированного ватного шарика.

В сыворотке крови определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) [2] и содержание малонового диальдегида (МДА) [12].

Статистическую обработку проводили с помощью программ Statistica 6.0. Достоверность различий оценивали при уровне достоверности  $p < 0,05$  с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 3 часа после субплантарного введения каррагина у экспериментальных животных развивался выраженный отек пораженной конечности, которая увеличивалась на 84,2% (мыши) и 86,8% (крысы) по сравнению с исходным объемом, что подтверждает развитие острой воспалительной реакции. Иная

картина наблюдалась в группе животных, получавших гипоксен. Так, прирост объема лапы у мышей составлял 36,4%, у крыс — 39,6%. Полученные результаты свидетельствуют, что у животных, которым предварительно вводили гипоксен, воспалительная реакция оказалась менее выраженной. Торможение воспаления при этом составляло 56,8% (мыши) и 54,4% (крысы).

Применение препаратов сравнения также способствовало уменьшению величины каррагинин-индуцированного отека. Объем пораженной конечности животных после введения симвастатина, увеличивался на 51,2% (мыши) и 53,4% (крысы). Торможение воспаления в этом случае составляло 39,2% (мыши) и 38,5% (крысы) по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор. Размер конечности грызунов, которым вводили ибупрофен, увеличивался на 26,3% (мыши) и на 29,5% (крысы), а торможение воспаления составляло — 68,8% (мыши) и 66,0% (крысы) в отличие от животных с индуцированным воспалением без лечения. Таким образом, на скрининговой модели острого экссудативного воспаления установлено, что предварительное введение гипоксена препятствует развитию каррагининового отека конечности грызунов (мыши, крысы) и сопоставимо по силе противовоспалительного эффекта с симвастатином, но уступает нестероидному противовоспалительному средству ибупрофену.

Результаты, полученные на модели хронического пролиферативного воспаления (табл. 1), показали, что на 13-е сутки после имплантации под кожу спины

■ Таблица 1. Влияние гипоксена и препаратов сравнения на образование гранулемной ткани и изменение содержания малонового диальдегида (МДА) и активности супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови в модели «ватной гранулемы» у крыс

№ п/п	Группы животных	Масса гранулемы (мг)		Расчетная величина массы гранулемы, характеризующая воспаление (мг)		Сыворотка крови	
		сырая ( $M_1$ )	высушенная ( $M_2$ )	экссудативная фаза ( $M_1 - M_2$ )	пролиферативная фаза ( $M_2 - M_0$ )	МДА (нмоль/мл)	СОД (у.е./мг белка)
1	Интактные					3,51 ± 0,12	1,37 ± 0,10
2	Имплантация ватного шарика (контроль)	1110,0 ± 45,2	209,0 ± 10,3	901,0	169,0	18,73 ± 0,24*	0,14 ± 0,05*
3	Имплантация ватного шарика + гипоксен	637,5 ± 39,1#	149,0 ± 10,0#	488,5	109,0	13,62 ± 0,14*#	0,56 ± 0,04*#
4	Имплантация ватного шарика + симвастатин	781,0 ± 38,6#	145,0 ± 12,6#	536,0	105,0	14,36 ± 0,18*#	0,49 ± 0,07*#
5	Имплантация ватного шарика + ибупрофен	628,8 ± 28,6#	141,0 ± 9,8#	487,8	101,0	12,41 ± 0,16*#	0,62 ± 0,07*#

# — различие достоверно в сравнении с группой 1 при  $p < 0,05$ ;  $M_0$  — масса ватного шарика — 10 мг (мыши), 40 мг (крысы). В каждой группе по 50 животных; \* — различие достоверно по сравнению с группой 1 при  $p < 0,05$ ; # — различие достоверно по сравнению с группой 2 при  $p < 0,05$ ; в каждой группе по 50 животных

крыс ватного шарика вокруг него развивалось гранулематозное воспаление (группа 2). Следует отметить, что образование гранулемы сопровождалось увеличением концентрации МДА (в 5,3 раза) и снижением активности СОД (в 9,8 раза) по сравнению с интактными животными, что свидетельствует об усилении процессов перекисного окисления липидов.

У животных, которым в течение 12 дней вводили в желудок через зонд гипоксен, симвастатин или ибупрофен, масса сырой гранулемы на 42,6% (группа 3), 29,6% (группа 4) и 43,4% (группа 5) соответственно оказалась меньше, чем в контроле (группа 2). Кроме того, в сыворотке крови на фоне терапии гипоксеном уменьшался уровень МДА (на 27,2%) и усиливалась активность СОД (в 4,1 раза) (группа 3). Использование препаратов сравнения — симвастатина и ибупрофена — также способствовало улучшению антиоксидантного статуса крови: концентрация МДА снижалась при введении симвастатина на 23,3% и ибупрофена на 33,7%, а активность СОД увеличивалась в 3,5 и 4,0 раза соответственно (группы 4, 5).

Таким образом, на моделях острого экссудативного и хронического пролиферативного воспаления выявлена выраженная противовоспалительная активность гипоксена, сопоставимая с таковой у типичного нестероидного противовоспалительного средства ибупрофена и гипополидемического препарата симвастатина.

Согласно воспалительной концепции патогенеза атеросклероза в его основе, помимо развития атерогенной дислипидотеинемии, лежат метаболические нарушения, способствующие повреждению эндотелия сосудов и формирующие хроническое воспаление сосудистой стенки [4, 14, 16], которое рассматривается как «мишень» для воздействия лекарственных средств. Применение в профилактике и лечении атеросклероза противовоспалительных средств, природных антиоксидантов в комплексе с препаратами, нормализующими липидный обмен, может явиться основой для более рационального и эффективного лечения заболевания. В связи с этим выявленная противовоспалительная активность гипоксена не только расширяет наши представления о фармакологических свойствах, но и обосновывает применение этого антигипоксанта, оказывающего выраженное гипополидемическое действие [10], в комплексной терапии пациентов с сердечно-сосудистыми и атеросклеротическими заболеваниями, сопровождающимися воспалением.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дриницина С. В., Затеишиков Д. А. Антиоксидантные свойства статинов. Кардиология. 2005; 4: 65–72.
2. Дубинина Е. Е., Сальникова Л. Ф., Ефимова Л. Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека. Лаб. дело. 1983; 10: 30–3.

3. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. М.: Наука, 2001. — 342 с.
4. Костюченко Г. И., Никитин Ю. П., Арзамасцев Д. Д. и др. Атеротромбоз, роль хронического воспаления. Атеросклероз. 2011; 7 (2): 49–56.
5. Крыжановский Г. Н. Введение в общую патофизиологию. М.: РГМУ, 2000. — 71 с.
6. Левченкова О. С., Новиков В. Е., Пожилова Е. В. Фармакодинамика и клиническое применение антигипоксантов. Обз. клин. фармакол. и лек. тер. 2012; 10 (3): 3–12.
7. Медведев Ю. В., Толстой А. Д. Гипоксия и свободные радикалы в развитии патологических состояний организма. М.: Терра-Календер и Промоушен, 2000. — 232 с.
8. Методические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунатян. М., 2012; 48: 746–58.
9. Оганов Р. Г., Аронов Д. М., Бубнова М. Г. Применение статинов — парадигма профилактики и лечения атеросклеротических заболеваний (фокус на аторвастатин). Кардиоваск. тер. профилактик. 2006; 5 (6): 95–107.
10. Окуневич И. В., Хныченко Л. К., Шабанов П. Д. Влияние гипоксена на изменение показателей липидного обмена в условиях экспериментальной дислипидотеинемии. Обз. клин. фармакол. и лек. тер. 2014; 12 (3): 26–9.
11. Применение гипоксена в общеклинической практике. 2006. — 65 с.
12. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977; 60–1.
13. Шабанов П. Д., Зарубина И. В., Новиков В. Е., Цыган В. П. Метаболические корректоры гипоксии. СПб.: Информ-Навигатор, 2010. — 912 с.
14. Buckley M. L., Ramji D. P. The influence of dysfunctional signaling and lipid homeostasis in mediating the inflammatory responses during atherosclerosis. Biochim. Biophys. Acta. 2015; 1852 (7): 1498–510.
15. Koh K. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammatory, and plaque stability. Cardiovasc. Res. 2000; 47: 648–57.
16. Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. 1999; 340: 115–26.
17. Siti H. N., Kamisah Y., Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). Vascul. Pharmacol. 2015; 1537–891.

## EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF INFLAMMATORY EFFECT OF HYPOXEN

L. K. Khnychenko, I. V. Okunevich

◆ **Summary:** The experimental model of acute carrageenan-induced inflammation and chronic model of the "cotton wool's granuloma" in mice and rats were used in the experiment. The changes in the volume of damaged limb with oedema and granuloma mass in groups of animals were registered. The effect of hypoxen (*polydihydroxyphenylenthiosulfonate sodium*) and comparative drugs simvastatin and ibuprophen on the inflammatory reaction was studied. Ibuprophen and simvastatin were shown to reduce the development of inflammatory reaction. The administration of hypoxen in dose of 50 mg/kg has got the significant efficiency in lowering of oedema degree and significant decreasing of inflammatory tissue assessed by granuloma mass.

◆ **Keywords:** inflammation; hypoxen; simvastatin; ibuprophen.

## REFERENCES

1. Drinitsina S.V., Zateyshchikov D.A. Antioksidantnye svoystva statinov [The antioxidant properties of statins]. *Kardiologiya*. 2005; 4: 65–72.
2. Dubinina E.E., Sal'nikova L.F., Efimova L.F. Aktivnost' i izofermentnyy spektr superoksiddismutazy eritrotsitov i plazmy krovi cheloveka [The activity and isozyme spectrum of superoxide dismutase of erythrocytes and human blood plasma]. *Lab. delo*. 1983; 10: 30–3.
3. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Men'shchikova E.B. Okislitel'nyy stress [Oxidative stress]. M.: Nauka, 2001. — 342 s.
4. Kostyuchenko G.I., Nikitin Yu.P., Arzamastsev D.D. i dr. Aterotromboz, rol' khronicheskogo vospaleniya [Atherothrombosis, the role of chronic inflammation]. *Ateroskleroz*. 2011; 7 (2): 49–56.
5. Kryzhanovskiy G.N. Vvedenie v obshchuyu patofiziologiyu [An introduction to the General pathophysiology]. M.: RGMU, 2000. — 71 s.
6. Levchenkova O.S., Novikov V.E., Pozhilova E.V. Farmakodinamika i klinicheskoe primeneniye antigipoksantov [Pharmacodynamics and clinical application of antihypoxants]. *Obz. klin. farmakol. i lek. ter.* 2012; 10 (3): 3–12.
7. Medvedev Yu.V., Tolstoy A.D. Gipoksiya i svobodnye radikaly v razvitiy patologicheskikh sostoyaniy organizma [Hypoxia and free radicals in development of pathological conditions of the body]. M.: Terra-Kalender i Promoushen, 2000. — 232 s.
8. Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu nesteroidnykh protivovospalitel'nykh lekarstvennykh sredstv [Guidelines for preclinical study non-steroidal anti-inflammatory drugs] / Pod. red. A. N. Mironova, N. D. Bunatyan. M., 2012; 48: 746–58.
9. Oganov R.G., Aronov D.M., Bubnova M.G. Primeneniye statinov — paradigma profilaktiki i lecheniya ateroskleroticheskikh zabolevaniy (fokus na atorvastatin) [The use of statins paradigm for the prevention and treatment of atherosclerotic diseases (focus on atorvastatin)]. *Kardiovask. ter. profilakt.* 2006; 5 (6): 95–107.
10. Okunevich I.V., Khnychenko L.K., Shabanov P.D. Vliyaniye gipoksena na izmeneniye pokazateley lipidnogo obmena v usloviyakh eksperimeta'noy dislipoproteinemii [The influence of hypoxen to change lipid metabolism in experimental dyslipoproteinemia]. *Obz. klin. farmakol. i lek. ter.* 2014; 12 (3): 26–9.
11. Primeneniye gipoksena v obshcheklinicheskoy praktike [The use of lipoxen in General practice]. 2006. — 65 s.
12. Stal'naya I.D., Garishvili T.G. Metod opredeleniya malonovogo dial'degida s pomoshch'yu tiobarbiturovoy kisloty. Sovremennyye metody v biokhimiye [Method of determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. Modern methods in biochemistry] / Pod red. V.N. Orekhovicha. M.: Meditsina, 1977; 60–1.
13. Shabanov P.D., Zarubina I.V., Novikov, V.E., Tsygan V.P. Metabolicheskie korrektoiry gipoksii [Metabolic correctors hypoxia]. SPb.: Inform-Navigator, 2010. — 912 s.
14. Buckley M.L., Ramji D.P. The influence of dysfunctional signaling and lipid homeostasis in mediating the inflammatory responses during atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015; 1852 (7): 1498–510.
15. Koh K. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammatory, and plaque stability. *Cardiovasc. Res.* 2000; 47: 648–57.
16. Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 115–26.
17. Siti H.N., Kamisah Y., Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul. Pharmacol.* 2015; 1537–891.

## ◆ Информация об авторах

Хныченко Людмила Константиновна — д.биол.н., ведущий научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12.

Окуневич Ирина Викторовна — к.биол.н., старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12.

Khnychenko Ludmila Konstantinovna — Dr. Biol. Sci. (Pharmacology), Leading Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia.

Okunevich Irina Viktorovna — PhD (Pharmacology), Senior Researcher, S.V. Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia.