

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТА АМИНОТИОЛОВОГО РЯДА В МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

УДК 616.832-004.2
doi: 10.17816/RCF16441-44

© **И.В. Окуневич**

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Для цитирования: Окуневич И.В. Эффективность антиоксиданта аминотиолового ряда в модели рассеянного склероза. – 2018. – Т. 16. – № 4. – С. 41–44. doi: 10.17816/RCF16441-44

Поступила: 11.10.2018

Одобрена: 10.12.2018

Принята: 21.12.2018

В опытах на адекватной модели рассеянного склероза — экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита, в результате создания патологического состояния путем иммунизации морских свинок энцефалитогенной смесью в полном адьюванте Фрейнда показано выраженное угнетающее действие триафена. Синтезированный препарат триафен с антигипоксическими и антиоксидантными свойствами использовали при хроническом введении в течение 35 дней, перорально в дозе 50 мг/кг. На модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита исследовали ряд иммунологических показателей, клиническую картину неврологических осложнений и тяжесть поражения центральной нервной системы у опытных морских свинок. В периферической крови оценивали изменение содержания

продуктов перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты. В другой серии опытов после инокуляции энцефалитогенной смеси в полном адьюванте Фрейнда изучали летальность подопытных животных и протективное действие препарата триафена. В настоящем исследовании установлено, что синтетический препарат аминотиолового ряда триафен на экспериментальной модели рассеянного склероза проявляет нейропротективное и иммуномодулирующее свойство, повышает устойчивость к интенсификации процессов перекисного окисления липидов.

◆ **Ключевые слова:** экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; перекисное окисление липидов; антиоксидант триафен.

THE EFFECTIVENESS OF THE ANTIOXIDANT AMINOTHIOL SERIES ON THE MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

© *I.V. Okunevich*

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Okunevich IV. The effectiveness of the antioxidant aminothiols series on the model of multiple sclerosis. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2018;16(4):41-44. doi: 10.17816/RCF16441-44

Received: 11.10.2018

Revised: 10.12.2018

Accepted: 21.12.2018

In the experiments on a reproducible adequate model of multiple sclerosis – experimental autoimmune encephalomyelitis as a result of the creation of pathological condition by immunization of guinea pigs with an encephalitogenic mixture in the complete Freund's adjuvant, a pronounced inhibitory effect of the Triafen preparation was shown. The synthesized preparation of Triafen with antihypoxic and antioxidant properties on the experimental autoimmune encephalomyelitis model was used for chronic administration for 35 days, orally at a dose of 50 mg/kg. This drug is known to be free radical scavenger. A number of immunological indices and the clinical picture of neurological complications and the severity of central nervous system damage in experimental guinea pigs were studied. The circulating antibody production was estimated using the

complement fixation test. In the peripheral blood, the content of lipid peroxidation products and antioxidant defense enzymes was evaluated. In another series of experiments, the lethality of animals after inoculation of the encephalitogenic mixture in Freund's complete adjuvant and the protective effect of Triafen's preparation were reproduced. In the present study, it has been established that the synthetic preparation of the aminothiols Triafen series on the experimental model of multiple sclerosis shows a neuroprotective and immunomodulating property, and increases the resistance to the intensification of LPO processes.

◆ **Keywords:** experimental autoimmune encephalomyelitis; lipid peroxidation; antioxidant Triafen.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) является органическим гетерогенным заболеванием со сложным симптомокомплексом и многоочаговым поражением

проводящих нейронных путей, триггерами которых являются факторы внешней среды. Основная терапия больных РС направлена на купирование аутоиммунного воспалительного процесса иммуномодулирующими и противовоспалительными средствами,

так как именно деструктивное повреждение миелиновых оболочек нервных волокон собственной иммунной системой приводит к развитию неврологических осложнений [1, 3, 5]. Множественность схем течения РС диктует необходимость дальнейшего поиска новых подходов к фармакологической коррекции этого заболевания. Вследствие активации окислительного стресса (ОС) в комплексной терапии РС патогенетически оправдано применение полифункциональных препаратов: нейро-, ангиопротекторов и антиоксидантов. Ранее у антигипоксанта и антиоксиданта гипоксена в эксперименте была обнаружена противовоспалительная активность [2]. В данной работе изучено другое активное синтетическое соединение аминотиолового ряда — триафен, новая разработка препарата гипоксена, полученного современным оптимизированным способом.

Цель исследования — выявить у триафена способность влиять на выраженность иммунологических и неврологических нарушений при моделировании РС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве наиболее адекватного метода воспроизведения РС использовали модель экспериментального аутоиммунного энцефалита (ЭАЭ), позволяющую изучать демиелинизирующие процессы в центральной нервной системе (ЦНС). ЭАЭ вызывали однократной подкожной инокуляцией в подушечки лап морских свинок энцефалитогенной смеси — основного белка миелина (ОБМ) из спинного мозга быка, в полном адьюванте Фрейнда. Через несколько дней у животных развивалась Т-лимфоцитарная инфильтрация головного мозга, происходила демиелинизация и, как следствие, возникали параличи. Изучаемый препарат триафен вводили перорально зондом в дозе 50 мг/кг ежедневно в течение 35 дней, начиная со второго дня после инокуляции. Эксперименты проводили в двух сериях на 75 взрослых беспородных морских свинок-самцах (400–450 г). В первой серии в двух опытных группах по 15 животных у 30 морских свинок оценивали летальность после введения индуцирующего сенсibilизирующего агента и защитное действие триафена. Во второй серии опытов исследование эффективности препарата триафена проводили на 45 морских свинок, которых разделили по 15 особей на три группы: первая — интактные животные, вторая — патологическая модель (ЭАЭ), третья — ЭАЭ + препарат триафен. Тяжесть заболевания оценивали по клиническому индексу (КИ) в баллах от 0 до 6 по наличию парезов и параличей у животных. Визуально и морфологически у подопытных животных исследовали неврологические симптомы и состояние нервных окончаний периферического и центрального отделов ЦНС. После иммунизации у морских свинок пятикратно забирали пробы крови для изуче-

ния на антитела против ОБМ. Миграционную активность лейкоцитов периферической крови исследовали с помощью пятиканальных плоских капилляров Перфильева–Габе. Реакцию торможения миграции лейкоцитов оценивали после инкубации при 37 °С гепаринизированной крови с ОБМ в течение 24 часов. По окончании опыта морских свинок выводили из эксперимента быстрой декапитацией. В отекающей крови изучали показатели, характеризующие состояние ОС и антиоксидантной защиты (АОЗ). В сыворотке крови определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА), а также концентрацию антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Однократное введение энцефалитогенной смеси вызывало заболеваемость у 100 % морских свинок второй группы (ЭАЭ) и приводило к появлению у этих животных характерной неврологической симптоматики в виде атаксии, двигательных парезов и параличей, нарушений тазовых органов, мозжечковых расстройств. КИ на пике заболевания составил 4,6 балла, кумулятивный индекс — 53,1 %, что характеризовало течение ЭАЭ в данном опыте как тяжелое. Летальность во второй группе (ЭАЭ) составила 30 %, в то время как у животных, получавших дополнительно препарат триафен, погибло только 6,6 % морских свинок. У животных третьей группы (ЭАЭ + препарат) клинические признаки ЭАЭ были отмечены лишь у 5 особей, а количество параличей конечностей было на 73,5 % ниже, чем во второй группе с патологией (ЭАЭ). У 10 морских свинок (66,5 %) третьей группы, получавших исследуемый препарат, вообще отсутствовали неврологические расстройства. Патоморфологические изменения в ЦНС во второй группе (ЭАЭ) характеризовались демиелинизацией, наиболее выраженной в спинном мозге, особенно в пояснично-крестцовом отделе. Кроме того, во второй группе (ЭАЭ) воспалительная инфильтрация, состоящая преимущественно из моноцитов и лимфоцитов, достигала максимума также в пояснично-крестцовом отделе спинного мозга и в толще сосудов белого вещества головного мозга. Важно подчеркнуть, что у животных, получавших дополнительно триафен, была отмечена наибольшая сохранность миелиновых оболочек нейронов. Частота обнаружения циркулирующих антител в третьей группе морских свинок (ЭАЭ + препарат) была наименьшей, а пик продукции антител приходился на 21-й день. Размеры зон миграции иммунокомпетентных клеток были различны по количеству во второй и третьей группах и преобладали во второй группе с патологией (ЭАЭ). Таким образом, в связи с тем, что в 3-й группе животных оказалось большинство выживших здоровых животных

■ Таблица 1. Влияние триафена на показатели перекисного окисления липидов и ферменты антиоксидантной системы в сыворотке крови морских свинок на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелиита

Группы животных	ГП липидов (усл. ед.)	МДА (нмоль/мл)	СОД (усл. ед.)	Каталаза (мкмоль/мл)
Первая — интактные морские свинки	4,1 ± 0,3	5,3 ± 0,2	0,97 ± 0,07	13,8 ± 0,5
Вторая — ЭАЭ	10,3 ± 0,7*	13,3 ± 0,6*	0,38 ± 0,02*	5,5 ± 0,2*
Третья — ЭАЭ + триафен	7,2 ± 0,6#	9,4 ± 0,5#	0,51 ± 0,04#	7,9 ± 0,3#

Примечание: * различия достоверны при сравнении первой и второй групп, $p < 0,05$; # различия достоверны при сравнении второй и третьей групп, $p < 0,05$.

и свинок с минимальными неврологическими расстройствами, можно предположить, что при введении триафена происходит угнетение развития ЭАЭ. При анализе периферической крови подопытных морских свинок была обнаружена связь между содержанием продуктов ПОЛ, ферментов АОЗ и тяжестью патологической модели РС. Ранее у морских свинок с ЭАЭ было показано значительное увеличение накопления продуктов ПОЛ — МДА и диеновых конъюгатов в крови и мозге животных [4]. В нашем опыте мы также наблюдали повышение содержания продуктов ПОЛ в периферической крови во второй группе морских свинок в 2,5 раза больше по сравнению с интактными животными первой группы. В третьей группе морских свинок (ЭАЭ + препарат), получавших дополнительно триафен, в крови было обнаружено снижение ГП и МДА на 29 и 30 % соответственно по сравнению с животными без лечения, что свидетельствовало о способности триафена уменьшать степень развития процессов ПОЛ. Кроме того, произошла коррекция антиоксидантных ферментов в сыворотке крови морских свинок — увеличение концентрации СОД и КАТ на 38 и 41 % соответственно по сравнению с группой не получивших лечения животных, что дает основание судить о наличии выраженной способности к АОЗ у изучаемого препарата триафена как средства с политропными свойствами (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно современным данным о патогенезе РС развивающийся иммунопатологический процесс при РС — сложноорганизованный по характеру и течению, аутоиммунные реакции вызывают воспалительный процесс и приводят к диффузным дегенеративным изменениям аксонов и гибели нейронов, возникает избыточная концентрация активных форм кислорода и продуктов ПОЛ [1, 3, 5]. Предполагают, что одной из причин распада миелина является не только мощный окислительный стресс, но и, возможно, хроническая гипоксия, вызывающая интоксикацию и метаболические нарушения. В этом случае применение в комплексной терапии РС фармакологических средств с антиоксидантной и противогипоксической активностью, может быть весьма полезно. В настоящее время

доказана эффективность нескольких иммунологических препаратов, воздействующих на аутоиммунные процессы при РС и относящихся к четырем различным классам: интерфероны бета-1 β (бетаферон, экставиа, ронбетал), интерфероны бета-1 α (авонекс, ребиф), глатимера ацетат (копаксон), иммуносупрессоры митоксантрон и натализумаб, представляющие собой моноклональные антитела [3, 6]. Данные активные препараты оказывают специфическое иммуномодулирующее и противовоспалительное действие, а также имеют неблагоприятные побочные эффекты. Так, при терапии копаксоном отмечены кожные и анафилактические реакции, бетаферон и ребиф увеличивают содержание нейтрализующих антител, финголимод вызывает отек макулы и рак кожи, а митоксантрон кардиотоксичен и угнетает функции костного мозга. Поэтому необходима дальнейшая разработка новых препаратов для терапии РС с минимальными нежелательными эффектами. Экспериментальными исследованиями подтверждено, что при создании модели ЭАЭ у опытных животных появляются характерные для РС неврологические симптомы, наблюдается повреждение мембранных структур — демиелинизация олигодендроцитов (ОДЦ) [1, 4]. Установлено, что статины, обладающие противовоспалительными, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами, препятствуют развитию параличей у мышей с ЭАЭ и способствуют восстановлению движений. Это происходит в результате связывания статинами молекул адгезии и замедления дегенерации прекурсов ОДЦ, то есть они оказывают выраженное нейропротективное действие. При моделировании РС наблюдается усиление интенсивности процесса ПОЛ и требуется адекватная коррекция содержания перекисных продуктов путем применения активных антиоксидантов.

В наших предварительных опытах было показано, что триафен представляет собой средство с антиоксидантным и противогипоксическим действием, оказывающее положительное влияние на энергообразование в клетке, способное уменьшать продукцию свободных радикалов и восстанавливать активность ряда ферментов АОЗ. Использование триафена на модели ЭАЭ и его защитное противовоспалительное действие в данном эксперименте подтвердило результаты наших предыдущих исследований, оценивающих влияние на экспериментальное воспаление.

Обнаруженное при моделировании РС свойство угнетать степень развития ЭАЭ под влиянием антиоксиданта и антигипоксанта триафена без нарушения защитных функций иммунной системы расширяет наше представление о его фармакологической активности, как политропного препарата метаболического типа действия.

ВЫВОДЫ

В настоящем исследовании установлено, что синтетический препарат аминотиолового ряда триафен на экспериментальной модели РС — ЭАЭ проявляет нейропротективное и иммуномодулирующее свойство, повышает устойчивость к интенсификации процессов ПОЛ, что позволяет предположить актуальность его дальнейшего изучения в качестве перспективного корректирующего средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sternberg Z. Promoting sympathovagal balance in multiple sclerosis; pharmacological, non-pharmacological, and surgical strategies. *Autoimmun Rev.* 2016;15(2):113-23. doi: 10.1016/j.autrev.2015.04.012.
2. Хныченко Л.К., Окуневи́ч И.В. Противовоспалительная активность гипоксена в эксперименте // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2015. – Т. 13. – № 3. – С. 35–38. [Khnychenko LK, Okunevich IV. Experimental assessment of inflammatory effect of hypoxen. *Reviews on clinical pharmacology and drug therapy.* 2015;13(3):35-38. (In Russ.)]. doi: 10.17816/RCF13335-38.
3. Coyle PK. Switching algorithms: from one immunomodulatory agent to another. *J Neurol.* 2008;255(Suppl 1):44-50. doi: 10.1007/s00415-008-1007-3.
4. Степаненко Е.М., Вилков Г.А., Крыжановский Г.Н. Состояние перекисного окисления липидов при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1984. – Т. 98. – № 9. – С. 336–338. [Stepanenko EM, Vilkov GA, Kryzhanovskiy GN. Lipid peroxidation in experimental allergic encephalomyelitis. *Biull Eksp Biol Med.* 1984;98(9):336-338. (In Russ.)]
5. Беленко Е.А., Воробьева О.В. Особенности вегетативного контроля сердечной деятельности у пациентов с ремиттирующей формой рассеянного склероза // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – Т. 112. – № 3. – С. 68–71. [Belenko EA, Vorob'eva OV. Characteristics of the autonomous control of cardiac activity in patients with remitting multiple sclerosis. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S.S. Korsakova.* 2012;112(3):68-71. (In Russ.)]
6. Gold R. Combination therapies in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008;255 Suppl 1:51-60. doi: 10.1007/s00415-008-1008-2.

♦ Информация об авторе

Ирина Викторовна Окуневи́ч — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, отдел нейрофармакологии им. С.В. Аничкова. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: irina_okunevich@mail.ru.

♦ Information about the author

Irina V. Okunevich – PhD (Pharmacology), Senior Researcher, S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: irina_okunevich@mail.ru.