

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Пожилова Е.В., 2014
УДК: 615.015.21:615.276

**ВЛИЯНИЕ АНТИГИПОКСАНТОВ НА РАЗВИТИЕ
КАРРАГЕНИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ**

Е.В. Пожилова

ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия МЗ РФ,
г. Смоленск

В эксперименте на модели острого каррагенин-индуцированного воспаления лапы крыс регистрировали изменения объема пораженной конечности (отек лапы), показатели лейкограммы и активность свободнорадикального окисления. Изучено противовоспалительное действие антигипоксантов (амтизол, гесперидин, гипоксен, метапрот). Показано, что гипоксен и метапрот в дозе 50 мг/кг обладают слабой противовоспалительной активностью, но потенцируют действие нестероидных противовоспалительных средств. При совместном энтеральном введении гипоксена и метапрота с ацетилсалициловой кислотой или диклофенаком отмечен мощный противовоспалительный эффект, что проявлялось существенным снижением регистрируемых показателей воспаления.

Ключевые слова: амтизол, гесперидин, гипоксен, метапрот, острое воспаление.

Лекарственные вещества с антигипоксическими и антиоксидантными свойствами сегодня широко применяются в медицинской практике [4, 7, 11, 13]. Пристальное внимание к антигипоксантам, их разностороннее экспериментальное и клиническое изучение обусловлены многообразным метаболотропным действием данной группы препаратов. В основе их фармакодинамики лежат различные метаболические механизмы, включая регуляцию потребления кислорода и энергетический обмен, воздействие на процессы свободнорадикального окисления и проницаемость клеточных мембран, влияние на регуляторные факторы клеточной адаптации и другие процессы [3, 9, 10, 12, 16]. В научной литературе имеются сведения о противовоспалительной активности антигипоксантов и возможности их применения в лечении воспалительных заболеваний [5, 14].

При фармакотерапии воспалений препаратами выбора, как известно, являются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС). Однако, несмотря на

несомненную клиническую эффективность, даже кратковременный прием данных препаратов может приводить к развитию побочных эффектов, которые в целом встречаются примерно в 25% случаев и могут представлять серьезную угрозу для жизни. Среди перспективных путей повышения эффективности и безопасности НПВС рассматривается, в частности, их комбинированное использование с антигипоксантами/антиоксидантами [8]. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение противовоспалительной активности антигипоксантов различного химического строения и их влияние на эффективность НПВС при остром экспериментальном воспалении.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Wistar массой 180-220 г. Острую воспалительную реакцию воспроизводили путем субплантарного введения 0,1 мл 1% водного раствора каррагенина в левую заднюю лапу опытным группам крыс [15]. Контрольным животным вводили равный объем воды очищенной.

В работе изучены вещества с антигипоксантной и антиоксидантной активностью различной химической структуры: амтизол (3,5-диамино-1,2,4-тиадиазол), гесперидин (5,3'-диокси-4'-метокси-7-рамноглокозид флавонона), гипоксен (натриевая соль [поли-{-2,5-дигидрокси-фенилен}-]4-тиосульфокислоты) и метапрот (2-этилтиобензимидазол гидробромид), которые вводили в дозе 50 мг/кг массы. Препараты сравнения – ацетилсалициловая кислота (АСК) в дозе 100 мг/кг и диклофенак натрия в дозе 8 мг/кг массы. Все лекарственные вещества вводили в виде водных растворов через зонд в желудок за 1 час до индукции воспаления. При комбинированном применении вещества вводили с интервалом 1 час.

Величину отека измеряли онкометрическим методом через 3 часа после индукции воспаления по изменению объема конечности экспериментальных животных [17]. Объем конечностей животных измеряли до введения и через 3 часа после введения каррагинина. В качестве критериев оценки противовоспалительной эффективности антигипоксантов и НПВС использовались: прирост объема конечности и торможение воспаления. Прирост объема конечности рассчитывали по формуле:

$$П = \frac{О - И}{И} \times 100 \%, \text{ где}$$

П – прирост отека;

О – величина объема лапы после введения индуктора воспаления;

И – величина объема лапы до введения индуктора воспаления.

Торможение воспаления рассчитывали по формуле:

$$100\% - \left(\frac{О - И}{И} (о) : \frac{О - И}{И} (к) \right) \times 100 \%, \text{ где}$$

о – леченные животные (опытные);

к – группа каррагинина.

Затем животных декапитировали под легким эфирным наркозом. В момент декапитации животных осуществляли забор крови. Подсчет лейкограммы проводили общепринятым методом [1]. По данным лейкограммы производили расчет агранулоцитарно/гранулоцитарного ин-

декса ($I_{a/g}$ – индекс противовоспалительной активности), представляющего собой отношение суммарных показателей агранулоцитов (лимфоциты и моноциты) и гранулоцитов (нейтрофилы и эозинофилы). Агранулоцитарно/гранулоцитарный индекс рассчитывали по формуле:

$$I_{a/g} = \sum \text{агранулоциты} / \sum \text{гранулоциты}.$$

Показатели свободнорадикального окисления (СРО) в сыворотке крови – интенсивность быстрой вспышки (Φ_{\max} – прямопропорциональна процессу ПОЛ) и величину светосуммы свечения (обратнопропорциональна активности антиоксидантной системы) регистрировали на отечественном хемилуминометре CL-3606 фирмы «Диалог» с помощью программы «CLM».

Статистическую обработку результатов опытов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica Version 6.0. Гипотезы о средних значениях проверяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Через 3 часа после субплантарного введения каррагинина у опытных крыс развивался выраженный отек пораженной конечности, объем которой существенно увеличивался и составлял $2,52 \text{ см}^3$, что на 73,8% больше исходного объема. У контрольных животных объем лапы не изменялся (табл. 1).

На фоне введения гипоксена и метапрота объем конечности увеличился по сравнению с контрольной группой животных на 49,6% и 56,5% соответственно, что было достоверно меньше, чем в опытной группе с каррагином. Предварительное введение амтизола и гесперидина не оказало статистически значимого влияния на развитие каррагининового отека, прирост объема конечности в обоих случаях был сопоставим с моделью. На фоне введения АСК и диклофенака увеличение объема конечности у опытных крыс было менее выраженное, соответственно на 24% и 10,5%.

При комбинированном применении гипоксена с АСК или диклофенаком для коррекции воспаления отмечено минимальное увеличение объема конечности,

причем данные показатели достоверно не отличались от значений контрольной группы, а торможение воспаления составило 81,3 и 90,4%. Метапрот тоже потенцировал действие АСК и диклофенака, торможение воспаления при его введении с НПВС составило 78 и 86,8%. Применение АСК в комбинации с амтизолом и гесперидином не отличалось по выраженности воспалительного отека от монотерапии только АСК.

Из приведенных результатов следует, что гипоксен и в меньшей степени метапрот уменьшают развитие каррагенин-индуцированного отека. При комбинированном применении с АСК и диклофенаком они потенцируют противовоспалительный эффект НПВС.

Результаты исследования лейкограммы экспериментальных животных представлены в таблице 2. Из таблицы следует, что во всех опытных группах

животных введение каррагенина вызывало относительную нейтрофилию с увеличением процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов на фоне общего лейкоцитоза. Такие изменения в лейкоцитарной формуле характерны для острого воспалительного процесса.

В группах животных, получавших АСК и диклофенак до введения каррагенина, подобные изменения были менее значительны. Антигипоксанты не оказали существенного влияния на лейкограмму, но их комбинации с АСК и диклофенаком были более эффективны, чем применение одних НПВС. При комбинированном применении гипоксена и метапрота с диклофенаком наблюдались минимальные изменения лейкограммы. Гипоксен и метапрот оказали потенцирующий эффект и на действие АСК. Амтизол и гесперидин при комбинированном введении с АСК существенно не изменяли показателей лейкограммы.

Таблица 1

Влияние антигипоксантов и НПВС на объем конечности крыс через 3 часа после введения каррагенина

Группы животных, (n=10)	Доза, мг/кг	Объем лапы, см ³ , (M±m)		Прирост объема, %	Торможение воспаления, %
		До введения	После введения		
Контрольная гр-па		1,43±0,05	1,44±0,06		
Каррагенин		1,45±0,05	2,52±0,07*	73,8	
Антигипоксанты + каррагенин					
Гипоксен	50	1,43±0,05	2,14±0,07*#	49,6	32,8
Метапрот	50	1,45±0,037	2,27±0,04*#	56,5	23,4
Амтизол	50	1,53±0,03	2,58±0,03*	68,6	7
Гесперидин	50	1,45±0,04	2,42±0,04*	66,9	9,3
НПВС + каррагенин					
АСК	100	1,46±0,04	1,81±0,07*#	24,0	67,5
Диклофенак	8	1,43±0,02	1,58±0,02#	10,5	85,8
Антигипоксанты + НПВС + каррагенин					
Гипоксен + АСК	50	1,37±0,08	1,56±0,04#	13,8	81,3
Гипоксен + Диклофенак	50 8	1,41±0,03	1,51±0,03#	7,1	90,4
Метапрот + АСК	50	1,48±0,056	1,72±0,06*#	16,2	78,0
Метапрот + Диклофенак	50 8	1,44±0,03	1,58±0,02#	9,7	86,8
Амтизол + АСК	50 100	1,53±0,05	1,97±0,06*#	28,7	61,1
Гесперидин + АСК	50 100	1,43±0,05	1,79±0,06*#	25,1	66,0

Примечание. В таблицах: * – различие с контролем статистически значимо (p<0,05); # – различие с каррагенином статистически значимо (p<0,05).

Таблица 2

Влияние антигипоксантов и НПВС на лейкограмму крови крыс при каррагинин-индуцированном воспалении

Группы животных (n=10)	Доза мг/кг	Лейкограмма крови крыс					I _{a/г} усл. ед.
		Нейтрофилы		Эозинофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %	
		Палочко-ядерные, %	Сегментоядерные, %				
Контроль		0,6±0,21	22,4±0,26	1,7±0,03	1,8±0,17	73,5±3,51	3,07±0,11
Каррагинин		1,1±0,62*	49,6±3,75*	0,9±0,07*	4,5±0,08*	43,8±3,98*	0,95±0,02*
Антигипоксанты + каррагинин							
Гипоксен	50	0,9±0,03	41,8±2,36#*	0,9±0,01*	4,2±0,31*	52,2±3,27#*	1,29±0,01*#
Метапрот	50	1,1±0,06*	44,2±2,24#*	0,9±0,03*	4,4±0,06*	49,4±3,88#*	1,16±0,02*#
Амтизол	50	1,2±0,08*	49,1±2,16*	0,8±0,02*	4,5±0,11*	44,4±2,12*	0,96±0,02*
Гесперидин	50	1,1±0,05*	48,9±2,68*	0,7±0,03*	4,5±0,12*	44,8±3,18*	0,97±0,03*
НПВС + каррагинин							
АСК	100	0,8±0,68	37,4±4,53#*	1,1±0,06*	3,4±0,21#*	57,3±5,38#*	1,55±0,03*#
Диклофенак	8	0,7±0,07	31,3±3,68#*	1,4±0,08#	2,8±0,18#*	63,8±4,52#*	1,99±0,02#
Антигипоксанты + НПВС + каррагинин							
Гипоксен + АСК	50 100	0,7±0,46	31,8±3,12#*	1,3±0,05#	2,2±0,28#	64,0±3,60#	1,98±0,08#
Гипоксен + Диклофенак	50 8	0,6±0,09#	25,5±2,54#	1,6±0,07#	1,9±0,08#	70,4±4,51#	2,64±0,1#
Метапрот + АСК	50 100	0,8±0,04	36,0±1,15#*	1,2±0,04#*	2,8±0,08#*	59,3±4,33#*	1,64±0,05*#
Метапрот + Диклофенак	50 8	0,6±0,04#	27,6±2,68#	1,3±0,05#	2,1±0,07#	68,4±4,22#	2,39±0,08#
Амтизол + АСК	50 100	0,9±0,05	44,3±1,91#*	1,0±0,04*	3,2±0,09#*	50,6±2,56#*	1,16±0,04*#
Гесперидин + АСК	50 100	1,3±0,21*	49,5±0,26*	0,79±0,03*	4,5±0,17*	43,9±3,51*	0,99±0,03*

Для интегрированной оценки противовоспалительной активности антигипоксантов и их комбинаций с НПВС был рассчитан индекс противовоспалительной активности (табл. 2). Наибольшее значение индекса отмечено в контроле – 3,07. При воспалении индекс уменьшается. На фоне применения препаратов антигипоксантов и НПВС наблюдается различная противовоспалительная активность, что видно не только по изменению объема конечности, но и по изменению индекса I_{a/г}. Наиболее эффективными оказались комбинации гипоксена с диклофенаком (I_{a/г}=2,64±0,1), метапрота с диклофенаком (I_{a/г}=2,39±0,08), гипоксена с АСК

(I_{a/г}=1,98±0,08) и метапрота с АСК (I_{a/г}=1,64±0,05). При сравнении прироста объема конечности с индексом I_{a/г} отмечено, что между данными показателями имеется обратная корреляционная зависимость (при r = – 0,96, p<0,05).

В следующей серии экспериментов мы изучили активность СРО в сыворотке крови экспериментальных животных через 3 часа после индукции воспаления, а также влияние антигипоксантов и НПВС на процессы пероксидации.

Результаты исследования активности процессов СРО представлены в таблице 3. Как следует из таблицы, интенсивность быстрой вспышки и величина

Таблица 3

Показатели свободнорадикального окисления сыворотки крови крыс при каррагенин-индуцированном воспалении и его фармакологической коррекции

Группы животных (n=10)	Доза мг/кг	Показатели свободнорадикального окисления, отн. ед.	
		Φ _{max} , отн. ед.	Величина светосуммы свечения, отн. ед.
Контрольная группа		2731±362,8#	36875±5327,0#
Каррагенин		6578±411,2*	72978,2±2383,2*
НПВС + каррагенин			
АСК	100	5836±385,7*#	56037±2539,5*#
Диклофенак	8	5743±354,6*#	52430±2146,4*#
Антигипоксантаы + каррагенин			
Гипоксен	50	3894±241,8*#	55873±2953,7*#
Метапрот	50	5873±134,5*#	65567±2561,8*#
Амтизол	50	5992±257,8*#	68253±2496,1*#
Гесперидин	50	5956±165,1*#	69164±1564,9*#
Антигипоксантаы + НПВС + каррагенин			
Гипоксен + АСК	50 100	3051±239,3#	42659±1076,6*#
Гипоксен + Диклофенак	50 8	2843±268,7#	38642±1246,2#
Метапрот + АСК	50 100	3464±257,2*#	43281±1964,6*#
Метапрот + Диклофенак	50 8	3525±195,7*#	44653±1564,3*#
Амтизол + АСК	50 100	4165±136,5*#	45274±1896,5*#
Гесперидин + АСК	50 100	4298±156,4*#	44281±1346,6*#

светосуммы свечения в группе животных, где применялся каррагенин, были достоверно выше (в 2,4 и в 2 раза соответственно) значений контрольной группы. Такие изменения показателей свидетельствуют об активации СРО (активация процессов ПОЛ и снижение активности антиоксидантной защиты).

В опытных группах крыс на фоне применения лекарственных препаратов показатели СРО увеличивались не так выражено, например, в группе, где применялась АСК, интенсивность быстрой вспышки увеличилась в 2,1 раза, а величина светосуммы свечения – в 1,5 раза по отношению к контролю. Примерно такие же изменения отмечались после введения диклофенака. Антигипоксантаы тоже снижали величину изучаемых показателей СРО, активированного каррагенином. Наиболее эффективно это отмечалось на

фоне приема гипоксена по показателю Φ_{max}. При назначении комбинаций гипоксена с диклофенаком или АСК, а также метапрота с диклофенаком или АСК наблюдалось максимальное угнетение СРО, индуцированного каррагенином. Показатели интенсивности быстрой вспышки и величины светосуммы свечения в этих группах опытных животных приближались к контрольным значениям. Комбинации амтизола и гесперицина с НПВС были менее эффективными.

Выраженное ингибирование процессов СРО при применении гипоксена и его комбинаций с НПВС в условиях острого воспаления, по-видимому, объясняется полигидрофениленовой структурой основного ядра гипоксена. Гидроксильные группы полигидрохинона легко отдают свой атом водорода, который может взаимодействовать с активным радикалом с

образованием пероксидов. В молекуле гипоксена одновременно может существовать до 12 гидроксильных групп, способных одновременно или последовательно связать большое количество свободных радикалов [2, 6].

Таким образом, субплантарное введение 1% водного раствора карагенина крысам вызывает через 3 часа развитие острой воспалительной реакции, которая проявляется выраженным отеком (увеличение объема лапы) пораженной конечности, характерными изменениями лейкограммы крови и активацией процессов СРО в сыворотке крови. Предварительное энтеральное введение опытным животным антигипоксантов (амтизол, гесперидин, гипоксен, метапрот) существенно не изменяет развитие воспалительной реакции. Слабое противовоспалительное действие оказывают гипоксен и метапрот в дозах 50 мг/кг. Однако применение антигипоксантов в комбинации с ацетилсалициловой кислотой или диклофенаком при остром карагенин-индуцированном воспалении сопровождается выраженным увеличением противовоспалительного эффекта НПВС. Наиболее эффективными оказались комбинации гипоксена с диклофенаком, метапрота с диклофенаком, гипоксена с АСК и метапрота с АСК. У животных, получавших эти комбинации лекарственных веществ на фоне введения карагенина, все регистрируемые признаки воспаления (прирост объема конечности, процент торможения воспаления, показатели лейкограммы, активность свободно-радикального окисления) были значительно меньше, а индекс противовоспалительной активности выше по сравнению с другими опытными группами животных. Данные результаты свидетельствуют о том, что гипоксен и метапрот потенцируют противовоспалительный эффект НПВС. Возможно, это связано с мощным антиоксидантным действием препаратов и подавлением экссудативной фазы воспаления.

Выводы

Гипоксен и метапрот в дозе 50 мг/кг массы оказывают слабое противовоспа-

лительное действие на модели острого карагенин-индуцированного воспаления. Применение гипоксена и метапрота в комбинации с диклофенаком или ацетилсалициловой кислотой потенцирует противовоспалительный эффект НПВС.

Литература

1. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика / А.А. Кишкун. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 350 с.
2. Левченкова О.С. Антигипоксанты: возможные механизмы действия и клиническое применение / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков // Вестник Смоленской гос. медицинской академии. – 2011. – №4. – С. 43-57.
3. Левченкова О.С. Индукторы регуляторного фактора адаптации к гипоксии / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2014. – №2. – С. 134-144.
4. Левченкова О.С. Фармакодинамика и клиническое применение антигипоксантов / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова // Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2012. – Т. 10, №3. – С. 3-12.
5. Новиков В.Е. Влияние гипоксена на эффективность кислоты ацетилсалициловой при остром воспалении / В.Е. Новиков, С.А. Илюхин // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2013. – Т. 76, №4. – С. 32-35.
6. Новиков В.Е. Фармакология и биохимия гипоксии / В.Е. Новиков, Н.П. Катунина // Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2002. – Т. 1, №2. – С. 73-87.
7. Новиков В.Е. Фармакология гепатопротекторов / В.Е. Новиков, Е.И. Климкина // Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2005. – Т. 4, №1. – С. 2-20.
8. Новиков В.Е. Гастропротекторные свойства мексидола и гипоксена / В.Е. Новиков, Н.О. Крюкова, А.С. Новиков // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2010. – Т. 73, №5. – С. 15-18.
9. Новиков В.Е. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксиче-

- ской активностью и мишени для их действия / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2013. – Т. 76, №5. – С. 37-47.
10. Новиков В.Е. Фармакология производных 3-оксипиридина / В.Е. Новиков, С.О. Лосенкова // Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии. – 2004. – Т. 3, №1. – С. 2-14.
11. Новиков В.Е. Влияние мексидола на течение посттравматической эпилепсии / В.Е. Новиков, Н.Н. Маслова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2003. – Т. 66, №4. – С. 9-11.
12. Новиков В.Е. К механизму антигипоксического действия нового комплексного соединения аскорбиновой кислоты / В.Е. Новиков, Е.О. Маркова, Э.А. Парфенов // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – №2. – С. 59-65.
13. Новиков В.Е. Аминотиоловые антигипоксанты при травматическом отеке мозга / В.Е. Новиков, Н.С. Понамарева, П.Д. Шабанов. – Смоленск; СПб.: Элби-СПб, 2008. – 176 с.
14. Тургенева Л.Б. Лечение воспалительных заболеваний пародонта мексидолом / Л.Б. Тургенева, В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова // Патогенез. – 2011. – Т. 9, №3. – С. 67.
15. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
16. Щулькин А.В. Исследование влияния фитоэкдистерона на выраженность окислительного стресса у крыс / А.В. Щулькин, В.В. Давыдов, Е.Н. Якушева // Вестн. Рос. военно-медицинской академии. – 2012. – №4. – С. 196-199.
17. An accurate and simple method for measurement of paw edema / M. Fereidoni [et al.] // Pharm. Toxicol. Methods J. – 2000. – Vol. 43. – P. 11-14.

INFLUENCE OF ANTIHYPOXANTS ON THE DEVELOPMENT OF CARRAGEENIN-INDUCED INFLAMMATION

E.V. Pogilova

In the experiment, on a model of acute carrageenin-induced inflammation of rat's paw, changes in size of the affected limbs (paw edema), parameters of leukogram and activity of free radical oxidation were registered. The anti-inflammatory effect of antihypoxants (amtizol, hesperidin, hypoxen, metaprot) was investigated. It has been shown that hypoxen and metaprot 50 mg/kg have weak anti-inflammatory activity, but potentiate the effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. At simultaneous enteral administration of hypoxen and metaprot with acetylsalicylic acid or diclofenac, evident anti-inflammatory effect was marked, that was manifested by significant reduction in registered inflammation symptoms.

Keywords: amtizol, hesperidin, hypoxen, metaprot, acute inflammation.

Пожилова Е.В. – соискатель кафедры фармакологии ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» МЗ РФ.

214019, г. Смоленск, ул. Крупской, д. 28.

E-mail: nau@sgma.info.