

УДК 615.276+615.322:582.475

ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ 2-(1'-ГИДРОКСИ-4'-ИЗОПРОПЕНИЛ-1'-МЕТИЛЦИКЛОГЕКСИЛ-2'-ТИО)-МЕТИЛЭТАНОАТОМ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА, ВОЗНИКШЕГО У КРЫС НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Акулина И.В., Никитина Л.Е., Гараев Р.С., Артемова Н.П., Степаненко И.С.

ФГБОУВПО Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия, e-mail: ir.ak-na@mail.ru

Изучено влияние 2-(1'-гидрокси-4'-изопропенил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната на процессы свободно-радикального окисления и его противовоспалительная активность на модели фетровой гранулемы. Показано, что исследуемый препарат повышает антиоксидантную защиту организма, эффективно снижает интенсивность свободно-радикального окисления и оказывает антипролиферативный эффект, не уступающий диклофенаку, что является подтверждением перспективности дальнейшего фармакологического исследования данного соединения.

Ключевые слова: тиотерпеноид, свободно-радикальное окисление, воспаление, антипролиферативная активность, диклофенак.

CORRECTION POSSIBILITY OF EXIDATIVE STRESS ARISING IN RATS ON THE BACKGROUND OF CHRONIC PROLIFERATIVE INFLAMMATION BY 2-(1'-HYDROXY-4'-ISOPROPENYL-1'-METHYLCYCLOHEXYL-2'-THIO)-METHYLETHANOATE

Akulina I.V., Nikitina L.E., Garaev R.S., Artemova N.P., Stepanenko I.S.

Kazan State Medical University, Kazan, Russia, e-mail: ir.ak-na@mail.ru

Impact of 2-(1'-hydroxy-4-isopropenyl-1'-methylcyclohexyl-2'-thio)-methylethanoate on processes of free radical oxidation and its anti-inflammatory activity on felt granuloma model has been studied.

It is shown that study drug increases the body's antioxidant defense, effectively reduces the intensity of free radical oxidation and it has antiproliferative effects is not inferior to diclofenac. Such results confirm the prospects of further pharmacological studies of this compound.

Keywords: terpenoid, free radical oxidation, inflammation, anti-proliferatory activity, diclofenac.

Одной из актуальных задач в терапии костно-мышечных заболеваний является оптимизация методов профилактики и коррекции хронических воспалительных процессов.

Общеизвестно, что любой патологический процесс воспалительного генеза сопровождается активацией свободнорадикальных процессов и снижением буферной емкости антиоксидантной системы (АОС), вызывая, таким образом, оксидативный стресс на клеточном уровне [9], что свидетельствует о необходимости поиска препаратов, обладающих антиоксидантным эффектом.

Биологически активные вещества растительного происхождения служат ценным источником создания лекарственных средств. К этим веществам относятся алкалоиды, дубильные вещества, сапонины, эфирные масла и др. [7, 9].

На кафедре общей и органической химии ГОУ ВПО Казанского государственного медицинского университета Росздрава под руководством заведующей кафедрой профессора Л.Е. Никитиной проводятся систематические исследования по модификации структуры различных терпеноидов [3, 10]. При этом фармакологическая оценка синтезированных соединений остается малоизученной.

Цель исследования

Изучение антиоксидантной и противовоспалительной активности одного из синтезированных тиосоединений 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната, используя метод фетровой гранулемы.

Материал и методы исследования

Эксперимент проводили на крысах обоего пола массой 200—250 г. Животных содержали в виварии при температуре воздуха 20°-22°С, естественном освещении, на подстилках из опилок деревьев лиственных пород. Рацион животных соответствовал приказу МЗ СССР №1179 от 10.10.1983 [6]. Кормление осуществлялось *ad libitum*, в первой половине дня при свободном доступе к воде. Для маркировки животных применяли спиртовой раствор пикриновой кислоты. Для исследования применялись здоровые животные с чистыми кожными покровами, прошедшие карантин в течение 14 суток. За 1-2 дня до эксперимента кожу животных освобождали от шерсти с помощью ножниц. Поверхность освобожденного от шерсти участка кожи составляла приблизительно 2,5х2,5 см, что составляет около 5 % от общей поверхности кожи животных.

В качестве препарата сравнения в работе использовали 2,5 % раствор по 3 мл в ампулах диклофенака натрия производства Хемофарм, который является современным мировым «золотым стандартом» лечения заболеваний, связанных с воспалительными процессами организма человека [5]. В эксперименте в качестве растворителя, повышающего проникающую способность исследуемого соединения через слизистые оболочки, нами использовалось фармакопейное оливковое масло. Смешивание исследуемой субстанции с растворителем осуществлялось при комнатной температуре механическим способом.

В работе использованы экспериментальные методики, рекомендованные Минздравом РФ и изложенные в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», Москва 2000 г. [8].

Хроническое пролиферативное воспаление у крыс вызывали имплантацией под кожу живота четырех простерилизованных фетровых дисков массой по 10 мг. Операцию выполняли под легким эфирным наркозом. В асептических условиях ножницами делался разрез кожи и подкожной клетчатки длиной около 1 см, пинцетом в подкожной клетчатке через разрез формировалась полость, куда помещался простерилизованный фетровый диск,

после чего на рану накладывалось два шва. Животные были распределены на три группы по десять животных в каждой. Ежедневно, в течение семи дней, однократно в сутки экспериментальной группе и группе сравнения внутрижелудочно вводили исследуемые вещества в виде водной эмульсии (в качестве эмульгатора использовали Твин-80), в объеме, не превышающем 0,5 мл. Экспериментальной группе вводили 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанойт, группа сравнения получала диклофенак, в дозе, эквивалентной по токсичности (1/60 ЛД₅₀). Контрольная группа животных получала 0,9 % раствор натрия хлорида также в объеме, не превышающем 0,5 мл. На восьмые сутки после операции животных забивали под легким эфирным наркозом, фетровые диски, с образовавшейся вокруг них грануляционной тканью, извлекали, взвешивали на торсионных весах и высушивали до постоянной массы при 60° С. Пролиферативную реакцию оценивали по разнице между массой высушенной гранулемы и исходной массой фетрового диска. Экссудативную реакцию оценивали по разнице между массой сырой и высушенной гранулемы. Противовоспалительное действие (влияние на пролиферативный и экссудативный компоненты хронического воспаления) выражали в процентах по отношению к контролю [8].

При изучении биохимических аспектов механизма флоготропного действия тиотерпеноида оценивали содержание в крови крыс глутатиона – его восстановленной и окисленной форм, антиоксидантного фермента – каталазы, продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов ненасыщенных высших жирных кислот (ДК) и малонового диальдегида (МДА) животных с хроническим пролиферативным воспалением на изучаемой модели фетровой гранулемы. Материал забирали у крыс, забитых под легким эфирным наркозом декапитацией, через час после последнего введения препарата. Кровь забирали в охлажденные центрифужные пробирки, органы тотчас после выделения погружали в жидкий азот. Содержание глутатиона (восстановленного, окисленного и суммарного) определяли спектрофотометрически по уменьшению интенсивности розово-фиолетового окрашивания палладий-хлорпромазинового комплекса в концентрированной фосфорной кислоте (максимум поглощения при 565 нм), используя модификацию метода, предложенную Чернышевым В.Г. [4]. Активность каталазы определяли по количеству разложившейся под влиянием фермента перекиси водорода. Концентрацию перекиси водорода определяли в реакции с молибдатом аммония на спектрофотометре СФ-16 при длине волны 410 нм. Уровень ДК оценивали по изменению оптической плотности гептановых экстрактов плазмы крови и гомогенатов органов при длине волны 233 нм. Содержание МДА определяли спектрофотометрически в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой с использованием набора реактивов производства фирмы «Агат»

(г. Москва) [2]. Исходя из представления о том, что большая часть МДА, реагирующего с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), образуется из промежуточных продуктов перекисного окисления липидов непосредственно при анализе пробы, под термином малоновый диальдегид подразумевали ТБК-взаимодействующие (реагирующие) продукты.

Полученные данные статистически обрабатывались с применением программы для анализа медико-биологических данных с использованием пакета прикладных программ «БИОСТАТ» 4.0.0.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Перед проведением собственно экспериментальной части исследования была осуществлена оценка острой токсичности 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната и препарата сравнения диклофенака в соответствии с общепринятыми методиками [1]. Установлено, что показатель острой токсичности изучаемого тиотерпеноида при внутрижелудочном введении составляет 10000 мг/кг, в то время как у диклофенака при аналогичном способе введения - 710 мг/кг. Таким образом, исследуемое тиосоединение в 14 раз менее токсично, чем препарат сравнения диклофенак.

Результаты, полученные при постановке модели хронического воспаления у крыс при помощи метода фетровой гранулемы, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика противовоспалительной активности 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната (M±m, n=10)

Соединения	Доза, мг/кг	Экссудация M±m, мг		Пролиферация M±m, мг	
Контроль	-	684,3±7,0	-	684,3±7,0	-
Диклофенак	11,8	533,4±6,1*	p<0,05	352,0±3,01*	p<0,05
2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанат	167,0	566,2±3,06*	p<0,05	210,0±3,36*	p<0,05

Примечание: M - среднее арифметическое, m - ошибка среднего арифметического, n - количество животных в группе, * - уровень статистической значимости различий при p<0,05 по сравнению с контролем.

По данным эксперимента изучаемый 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанат уменьшал фазу экссудации на 38,05 % и фазу пролиферации на 56,3 % относительно контроля и соответственно на 2,5 % и 18,2 % относительно препарата сравнения.

Оценка результатов показывает, что синтезированное соединение 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанат проявляет антипролиферативное действие, подавляя процессы пролиферации и экссудации на модели фетровой гранулемы у крыс, не уступающее таковому для диклофенака.

При изучении биохимических показателей крови крыс установлено, что хроническое пролиферативное воспаление, вызванное подкожной имплантацией фетрового диска,

сопровождается увеличением содержания гидроперекисей в плазме крыс на 200 %, повышением уровня МДА на 350 % по сравнению с интактными животными, другие показатели были достоверно неразличимы (Табл. 2)

Таблица 2

Биохимические показатели крови крыс с «фетровой» гранулемой, на фоне введения 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната в дозе 167 мг/кг на восьмые сутки развития гранулемы (M±m, n=10)

Группы	МДА, мкМ/л	ДК, мкМ/л	СГ, мкМ/л	ВГ, мкМ/л	ОГ, мкМ/л	Каталаза, м кат/л	ВГ/СГ	ОГ/СГ
Интактные	2±0,5	5,0±1,0	1212±4,0	83±2,0	1129±3	1,2±0,2	0,068±0,005	0,93±0,01
Контроль	9±0,3**	15±2,0**	1191±5,5	83±1,5	1108±6,5	1,3±0,16	0,069±0,004	0,93±0,004
% инт.	450	300	98	100	98	108	101	100
I	7±0,97**	10±1,4**	1182±3,9	82±2,0	1100±2,1	1,25±0,18	0,069±0,0045	0,93±0,01
% инт.	350	200	97	99	85	104	101	100
% контроль	78	67	99	99	87	96	100	100
II	3±0,3*	7±2,7*	1118±3,2**	103±1,8*	1015±3,1*	1,1±0,1	0,092±0,01*	0,91±0,01
% инт.	150	140	92	124	90	92	135	98
% контроль	43	47	94	124	92	85	133	98

Примечание: M - среднее арифметическое, m - ошибка среднего арифметического, n - количество животных в группе, МДА – малоновый диальдегид, ДК – диеновые конъюгаты, СГ – суммарный глутатион, ВГ – восстановленный глутатион, ОГ – окисленный глутатион, I - 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанат в дозе 167,0 мг/кг, II – диклофенак в дозе 11,8 мг/кг, % инт. – процент к интактной группе животных;

** - уровень статистической значимости различий при $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** - уровень статистической значимости различий при $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными.*

На фоне введения диклофенака в дозе 11,8 мг/кг, оказывающей противовоспалительное действие на модели фетровой гранулемы, изменения показателей ПОЛ в плазме крови крыс были сопоставимы с таковыми контрольной группы животных.

2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанат, введенный крысам в дозе 167 мг/кг, вызывает уменьшение концентрации МДА на 57% по сравнению с контрольным уровнем, не изменяя его уровень по сравнению с показателями крыс интактной группы ($p < 0,05$). Изучаемый тиотерпеноид статистически достоверно уменьшает уровень гидроперекисей плазмы крови крыс на фоне воспаления (показатель снизился на 53%), но не доводит данный показатель до интактного уровня, способствуя, таким образом, частичной нормализации уровня ДК. Достоверных различий между группами в активности фермента каталазы в ходе эксперимента не наблюдается.

Курсовое введение животным 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната в условиях хронического пролиферативного воспаления достоверно снижает концентрацию окисленного глутатиона (ОГ) в 0,9 раза как по сравнению с контролем, так и по сравнению с интактными животными, при этом сопряженно увеличивается содержание восстановленного глутатиона (ВГ) в 1,2 раза по сравнению с

обеими группами сравнения. Уровень суммарного глутатиона (СГ) у крыс опытной группы, получавших изучаемый тиотерпеноид в дозе 167 мг/кг, в 0,9 раза ниже, чем у животных контрольной группы и группы интактных крыс.

Для более наглядного изучения влияния 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаната на соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона были вычислены индексы соотношения ВГ/СГ, ОГ/СГ. В контрольной группе и группе интактных животных соотношение различных форм глутатиона достоверно не отличается, о чем свидетельствуют данные таблицы 2. Экспериментально установлено, что изучаемый тиотерпеноид способствует увеличению показателя ВГ/СГ и снижению индекса ОГ/СГ в процентном соотношении по сравнению с обеими группами сравнения. Так, соотношение ВГ/СГ на 33 % превосходит показатель контрольной группы и на 35 % – интактной группы ($p < 0,05$). Индекс ОГ/СГ в опытной группе, получавшей 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанат, на 2 % меньше показателей обеих групп сравнения. Таким образом, исследуемое тиосоединение снижет общее количество глутатиона за счет увеличения доли восстановленного глутатиона.

Заключение

Обобщая результаты исследования, необходимо отметить, что хроническое пролиферативное воспаление на модели фетровой гранулемы сопровождается активацией ПОЛ и снижением активности эндогенной АОС.

2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанат, обладая низкой токсичностью, проявляя свое противовоспалительное действие, корригирует явления оксидативного стресса: снижает повышенную, в результате воспаления, концентрацию МДА – интегрального показателя интенсивности ПОЛ, нормализует содержание гидроперекисей липидов крови, увеличивает концентрацию ВГ, изменяет соотношение окисленной и восстановленной форм в сторону последней, снижая общее количество глутатиона, что свидетельствует о целесообразности его для дальнейшего фармакологического изучения.

Список литературы

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта/ М.Л. Беленький. 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Медицина, 1963. – 171 с.
2. Валеева И.Х. Биохимические методы исследования общих механизмов повреждения и воздействия ксенобиотиков: учебно-метод. пособие / Валеева И.Х., Зиганшина Л.Е. – Казань: КГМУ, 1998. – 34 с.
3. Гаврилов В.В. Синтез и противогрибковая активность сульфидов, сульфоксидов, сульфонон на основе (1S)-(-)- β -пинена / В.В. Гаврилов, В.А. Старцева, Л.Е. Никитина, О.А.

Лодочникова, О.И. Гнездилов, С.А. Лисовская, Н.И. Глушко, Е.Н. Климовицкий // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. - Т. 44, № 3. - С. 17-20.

4. Горошинская И. А. Интенсивность ПОЛ при периодической гипоксии и защитном действии пиразидола/ И. А. Горошинская, Л. В. Могильницкая // Биохимия. - 1996. – Т.59, №7. – С.46.

5. Насонов Е. Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов: терапевтические перспективы / Е. Л. Насонов // Русский медицинский журнал. – 2002. – Т. 10, № 4. – С. 206-212.

6. Приказ МЗ СССР №1179 от 10.10.1983 «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения».

7. Ткаченко К.Г. Абиотическая активность эфирных масел высших растений. Современные достижения и аспекты использования/ К.Г. Ткаченко, Н.В. Казаринова // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы 7 международного съезда Фитофарм. – Санкт-Петербург, 2003. – С. 284-286.

8. Шварц Г.Я. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ Г.Я. Шварц, Р.Д. Сюбаев; под общ. ред. В.П. Фисенко. – М.: ИИА Ремедиум, 2000. - С. 234-241.

9. Шутова А.Г. Оценка антиоксидантной активности экстрактов и эфирных масел пряно-ароматических и лекарственных растений / А.Г. Шутова // Раст. ресурсы. – 2007. – Т. 43, вып. 1. – С. 112-125.

10. Nikitina L.E. Antifungal activity of bicyclic monoterpenoids and terpenesulfides / L.E. Nikitina, V.A. Startseva, L.Yu. Dorofeeva, N.P. Artemova, I.V. Kuznetsov, S.A. Lisovskaya, and N.I. Glushko // Chemistry of Natural Compounds. (Translated from Khimiya Prirodnikh Soedinenii). – Uzbekistan, Tashkent, 2010. – Vol. 46, №1. – P. 28-32.

Рецензенты:

Арсютов В.П., д.м.н., профессор, зав. кафедрой факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары.

Инчина В.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии с курсом фармакологии Медицинского института ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарева», г. Саранск.

Работа получена 24.10.2011.