

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СРЕДСТВА

ДИМЕФОСФОН ПРОЯВЛЯЕТ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ НА МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО АУТОИММУННОГО ВОСПАЛЕНИЯ

И. Х. Валеева, А. Ф. Титаренко, В. Н. Хазиахметова, Л. Е. Зиганшина¹

В экспериментах на белых крысах при моделировании хронического аутоиммунного воспаления лап путем введения адьюванта Фрейнда оценен противовоспалительный эффект димефосфона, ксидифона и ионола, их влияние на показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов крови. Адьювант типа Фрейнда вызывал развитие хронического аутоиммунного воспаления, повышение интенсивности процессов ПОЛ, уровня нитрит-иона. Противовоспалительный эффект выявлен только у димефосфона. Интенсивность ПОЛ снижали димефосфон и ионол, ксидифон не влиял на процессы перекисидации крови.

Ключевые слова: адьювант Фрейнда, перекисное окисление липидов, кровь, димефосфон, ксидифон (этидронат), ионол (дибунол)

ВВЕДЕНИЕ

В патогенезе поражений суставов при хронических аутоиммунных системных заболеваниях ведущую роль играют свободные радикалы кислорода, интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), повышение уровня метаболитов оксида азота (II) и нарушения антиоксидантной системы (АОС) [8]. Лекарственные средства, используемые для лечения заболеваний суставов, при длительном применении вызывают развитие различных нежелательных эффектов [10, 13, 14]. В связи с этим одним из приоритетных направлений отечественной медицинской науки является изыскание и внедрение новых отечественных фармакологических средств, способных эффективно корректировать нарушения процессов ПОЛ и АОС, возникающих при хроническом аутоиммунном воспалении суставов. Ранее на различных моделях воспаления нами была показана противовоспалительная активность димефосфона, его способность снижать интенсивность ПОЛ и повышать активность окислительно-восстановительной системы глутатиона [4–6, 9–12]. Изучались эффекты ксидифона на перекисидацию липидов [4–6, 12].

Наиболее адекватной моделью поражений суставов при системных заболеваниях соединительной ткани,

используемой для оценки эффективности противоревматических средств, является модель артрита, вызванная введением адьюванта Фрейнда [15].

Цель настоящего исследования — оценка влияния димефосфона (ДМФ), ксидифона (КС), ионола на воспалительную реакцию, процессы перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в крови крыс на модели хронического аутоиммунного воспаления суставов, вызванного введением адьюванта Фрейнда.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 40 беспородных белых крысах обоего пола, массой 180–200 г, разделенных на 5 групп, по 8 в каждой, содержавшихся в стандартных условиях вивария. Первая группа — интактные животные. У животных 4 опытных групп вызывали развитие адьювантного артрита путем введения в подушечку левой задней лапы 0,1 мл адьюванта Фрейнда [15]. Интенсивность формирования патологического процесса у животных оценивали по степени прироста объема лап, которую определяли плетизмометром Ugo Basile по разности объемов лап до введения адьюванта Фрейнда и на 3, 7, 11, 15, 20, 27, 31, 38, 41-е сутки после его введения. Исследователь, осуществлявший измерение объема лап крыс плетизмометром, был “ослеплен” относительно принадлежности крыс к тем или иным группам исследования. Развитие вторичного артрита оценивали по увеличению объема голеностопных суставов задних, передних лап и хвоста. Степень отека лап выражали в % прироста их объема по сравнению с исходными показателями. С момента введения адьюванта крысам опытных групп в желудок с помощью зонда вводили изучаемые препараты в равномолярных дозах, соответствующих

¹ Центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — С. Р. Абдулхаков). ГОУ ВПО “Казанский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию”, Казань, ул. Бутлерова, 49.

Кафедра клинической фармакологии и фармакотерапии (зав. — проф. Л. Е. Зиганшина) ГОУ ДПО “Казанская государственная медицинская академия Росздрава”, 420012, Казань, ул. Мухомарова, 11.

1 мМ/кг массы тела в сутки: димефосфон — 208 мг/кг [12], ксидифон (этиндронат) в дозе 45 мг/кг [1], эталонный антиоксидант ионол — 220 мг/кг [2]. Крысам контрольной группы ежедневно внутрижелудочно вводили дистиллированную воду по 1 мл/100 г массы тела. На 41-е сутки животных декапитировали под легким эфирным наркозом. Показатели процессов ПОЛ и АОС крови определяли на 15-й и 41-й дни эксперимента. Определяли активность каталазы, пероксидазы, содержание суммарного (СГ), восстановленного (ВГ) и окисленного глутатиона (ОГ) в эритроцитах крови [3], уровень церулоплазмينا (ЦП), диеновых конъюгатов (ДК) ненасыщенных высших жирных кислот и ТБК-взаимодействующих продуктов ПОЛ (МДА) [3], нитрит-иона [7], общую антиокислительную активность (ОАО) сыворотки крови [3]. Результаты исследований обработаны статистически с использованием критерия t-Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первичную реакцию на введение адьюванта Фрейнда (отек голеностопного сустава левой задней лапы) наблюдали через сутки после воспроизведения модели в виде признаков воспаления конечности, интенсивность которой определяли по величине отека лап. Крысы щадили пораженную лапу (левую), держали ее навесу и сидели друг от друга на расстоянии. На

вторые сутки величина отека лап между группами крыс, получавшими изучаемые препараты, и контрольными животными (показатели которых приняты за 100 %) не различалась. На 11-е сутки с момента введения адьюванта у 20 % животных развились отеки лап других конечностей (вторичный артрит) с изъязвлениями. Введение димефосфона способствовало уменьшению отека левой лапы крыс на 3-й, 7-й, 11-й, 15-й, 20-й, 27-й, 31-й, 38-й, 41-й дни исследования относительно показателей животных группы контроля. Ионол на 11-е сутки исследования снижал отек как левой, так и правой лап крыс. Ксидифон проявлял противовоспалительное действие только на контралатеральной лапе на 27-й день, снижая интенсивность отека на 59 % (табл. 1).

На 15-й день эксперимента в сыворотке крови крыс отмечено повышение содержания ДК и МДА, повышение активности пероксидазы крови относительно животных интактной группы, снижение уровня суммарного глутатиона за счет уменьшения его окисленной формы, что свидетельствует об истощении мощности неферментного звена АО-защиты [14]. Введение димефосфона, ксидифона в течение 15-ти дней не влияло на показатели ПОЛ и АОС. Ионол снижал содержание ДК и МДА крови крыс до уровня интактных животных (табл. 2). На 41-е сутки после инъекции адьюванта уровень ДК сыворотки крови крыс был в 1,6 раза выше, а уровень МДА — в 2 раза выше отно-

Таблица 1. Показатели прироста объема лап крыс (в %) после введения адьюванта Фрейнда и исследуемых соединений (внутри), относительно исходных значений, $M \pm m$

Срок регистрации	Контроль (вода)	Димефосфон, 208 мг/кг	Ксидифон, 45 мг/кг	Ионол, 220 мг/кг
Л.л., 3-й день, % к контролю	86,8 ± 8,4 100	68,1 ± 6,4** 78,4	91,4 ± 18,4 105	97,1 ± 16,4 112
Л.л., 7-й день, % к контролю	88,0 ± 10,2 100	58,0 ± 8,5* 66	81,2 ± 11,9 92	80,5 ± 17,1 91
Л.л., 11-й день, % к контролю	87,2 ± 8,0 100	55,6 ± 9,7* 64	81,2 ± 12,0 93	56,8 ± 10,4* 65
П.л.	17,2 ± 5,9	6,96 ± 4,1	15,0 ± 3,6	5,6 ± 2,2**
Л.л., 15-й день, % к контролю	87,9 ± 6,8 100	59,3 ± 4,4* 67	75,9 ± 14,6 86	85,3 ± 19,3 97
П.л.	10,0 ± 3,3	7,45 ± 3,4	17,7 ± 3,7	9,7 ± 4,5
Л.л., 20-й день, % к контролю	83,1 ± 7,1 100	47,8 ± 11,5* 58	68,8 ± 8,6 83	70,4 ± 16,6 85
П.л.	14,2 ± 4,5	3,6 ± 1,9*	8,85 ± 4,0	9,7 ± 7,4
Л.л., 27-й день, % к контролю	54,3 ± 7,8 100	27,1 ± 7,7* 50	50,7 ± 13,6 94	68,6 ± 24,5 129
П.л.	6,8 ± 3,0	3,7 ± 2,2	2,85 ± 1,3*	9,8 ± 6,7
Л.л., 31-й день, % к контролю	46,5 ± 5,2 100	26,1 ± 5,9* 55	75,9 ± 24,0 166	54,4 ± 16,5 116
П.л.	5,6 ± 2,6	2,8 ± 1,8	4,1 ± 2,3	10,9 ± 5,5
Л.л., 38-й день, % к контролю	49,4 ± 4,0 100	25,1 ± 3,6* 51	58,7 ± 14,8 120	48,2 ± 13,1 99
П.л.	7,5 ± 4,9	0,42 ± 0,3*	3,9 ± 2,2	3,5 ± 1,4
Л.л., 41-й день, % к контролю	52,8 ± 14,0 100	23,9 ± 3,1* 45	58,9 ± 14,6 113	58,1 ± 15,9 109
П.л.	2,5 ± 1,9	2,8 ± 2,0	8,0 ± 4,4	12,1 ± 9,0

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с контролем; ** — $0,05 < p < 0,1$ в сравнении с контролем, Л.л. — левая лапа, П.л. — правая лапа.

сительно показателей интактных животных. Стабильно высокое содержание продуктов ПОЛ привело к снижению ОАО сыворотки и уменьшению уровня сывороточного антиоксиданта ЦП относительно показателей крыс интактной группы. В системе глутатионового буфера крови отмечено увеличение содержания ОГ и СГ, что свидетельствует об усилении процессов ПОЛ [14]. На 41-е сутки после введения адьюванта Фрейнда отмечено увеличение содержания нитрит-иона в сыворотке крови на 225 % относительно интактных животных (табл. 2).

Резкое повышение уровня конечного продукта метаболизма окиси азота — нитрит-иона в крови, наблюдаемое при развитии адьювантного артрита, по-видимому, связано с увеличением продукции окиси азота активированными макрофагами, которая, по литературным данным, может увеличиваться более чем в 1000 раз [7, 8]. Синтез окиси азота рассматривается как защитный механизм, направленный против цитотоксического действия фагоцитов, что связано с ингибированием окисью азота активации нейтрофилов, активностью НАДФН-оксидазы и способностью окиси азота эффективно взаимодействовать с активными радикалами кислорода, в результате чего снижается продукция перекиси водорода, гипогалоидов и др. [8].

Введение димефосфона в течение 40 суток способствовало снижению уровня МДА и ДК в крови, повы-

шению ОАО сыворотки крови, повышению содержания нитрит-иона в сыворотке крови по сравнению с показателями контрольных крыс. В сравнении с интактными крысами уровень нитрит-иона на фоне димефосфона выше в 4,6 раза (табл. 2).

Показатели ПОЛ и АОС на фоне приема ксидифона не отличались от показателей контроля модели. Относительно интактной группы ксидифон увеличивал содержание ДК и МДА, уровень нитрит-иона, повышал активность пероксидазы, снижал ОАО сыворотки крови.

Ионол снижал уровень ДК и МДА, нитрит-иона, повышал ОАО сыворотки крови, активность каталазы относительно контроля модели. Содержание ЦП крови на фоне применения ионола было ниже относительно показателей как интактных, так и контрольных крыс. В сравнении с интактными крысами уровень нитрит-иона на фоне ионола был выше в 1,6 раза (табл. 2).

Результаты исследования, полученные при моделировании хронического аутоиммунного воспаления лап крыс, позволяют предположить, что активация ПОЛ может быть связана с уменьшением “мощности” антиоксидантной защиты клетки, что подтверждается к 41-у дню эксперимента. Показано, что на фоне введения адьюванта Фрейнда димефосфон проявлял противовоспалительный эффект: с 3-го по 40-й день исследования снижал отек лап крыс, в то время как ксидифон и ионол такого эффекта не проявляли. Димефос-

Таблица 2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов, активность антиоксидантных ферментов, уровень нитрит-иона в крови крыс через 15 и 40 дней после введения адьюванта Фрейнда и исследуемых соединений (внутри), $M \pm m$

Показатель	Группы животных				
	интактные	контроль (вода)	димефосфон, 208 мг/кг	ксидифон, 45 мг/кг	ионол, 220 мг/кг
<i>15-й день исследования</i>					
ДК, мкмоль/л	9 ± 0,6	11 ± 0,8*	11 ± 0,9*	11 ± 0,7*	8 ± 0,7 [#]
МДА, мкмоль/л	2 ± 0,2	4 ± 0,6*	4 ± 0,9*	4 ± 0,4*	2 ± 0,3 [#]
ВГ, мкмоль/л	194 ± 37,5	213 ± 24,6	202 ± 30,8	235 ± 35,2	243 ± 66,1
ОГ, мкмоль/л	1267 ± 142,3	895 ± 133,3*	1002 ± 85,7	822 ± 138,7	1013 ± 114,6
СГ, мкмоль/л	1462 ± 116,5	1108 ± 116,3*	1204 ± 83,1*	1057 ± 123,2*	1258 ± 75,1
<i>41-е сутки исследования</i>					
ДК, мкмоль/л	5 ± 0,5	13 ± 1,8*	7 ± 0,6 [#]	15 ± 3,4*	4 ± 0,4* [#]
МДА, мкмоль/л	4 ± 0,7	8 ± 0,8*	6 ± 0,2* [#]	9 ± 0,8*	5 ± 0,2* [#]
Каталаза, мккатал/л	584749 ± 22168	542541 ± 11976	585248 ± 16728 [#]	573522 ± 11830	603586 ± 17725 [#]
Пероксидаза, мкмоль/мин/л	100 ± 4,9	111 ± 5,4	121 ± 5,2*	121 ± 8,2*	98 ± 11,2
ОАО, %	79 ± 0,7	63 ± 2,7*	82 ± 4,9 [#]	55 ± 4,8	70 ± 2,2 [#]
ЦП, мг%	61,0 ± 1,7	54,0 ± 1,7*	55,0 ± 2,4	53,0 ± 2,2*	48,0 ± 2,3* [#]
<i>Содержание нитрит-иона, глутатиона восстановленного (ВГ), окисленного (ОГ) и суммарного (СГ) в сыворотке крови крыс на 41-й день исследования</i>					
Нитрит-ион, мкмоль/л	8 ± 1,22	26 ± 3,89*	37 ± 7,56*	25 ± 3,8*	13 ± 1,9* [#]
ВГ, мкмоль/л	85 ± 6,7	84 ± 0,9	83 ± 1,6	86 ± 1,6	80 ± 1,4 [#]
ОГ, мкмоль/л	1889 ± 10,1	1942 ± 22,3*	1909 ± 42,7	1879 ± 30,4	1928 ± 47,8
СГ, мкмоль/л	1974 ± 24,0	2037 ± 18,4*	1992 ± 41,3	1965 ± 29,0	2007 ± 46,5

Примечание. * — $p < 0,05$ относительно интактных крыс; [#] — $p < 0,05$ относительно контроля; ОАО — общая антиокислительная активность, ЦП — церулоплазмин, ДК — диеновые конъюгаты, МДА — малоновый диальдегид.

фон повышал ОАО сыворотки крови и уровень нитрит-иона, снижал интенсивность свободнорадикальных процессов. Ксидифон на фоне введения адьюванта не влиял на содержание нитрит-иона и на процессы перекисидации липидов. Димефосфон оказывал как противовоспалительное, так и антиоксидантное действие в отличие от эталонного антиоксиданта ионола, который не проявлял флоготропного эффекта. Возможно, в реализации противовоспалительного эффекта димефосфона играют роль другие механизмы.

Влияние димефосфона на уровень нитрит-иона позволяет отличить его антиоксидантный эффект от антиоксиданта ионола. Увеличение содержания нитрит-иона под влиянием димефосфона, установленное на модели адьювантного артрита, свидетельствует о его закономерном влиянии на NO-зависимые процессы. Вероятно, в механизме противовоспалительного и антиоксидантного эффектов димефосфона определенную роль имеет защитный механизм, связанный с нитроксидергической системой, описанный различными авторами [7, 8].

Таким образом, димефосфон, в отличие от ксидифона и ионола, проявлял противовоспалительную активность и комплекс антиоксидантных эффектов, сопоставимых с эталонным антиоксидантом ионолом. Полученные экспериментальные данные обосновывают целесообразность клинических исследований димефосфона при системных поражениях суставов.

ВЫВОДЫ

1. При моделировании хронического аутоиммунного воспаления лап крыс адьювантом Фрейнда повышается содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов, происходит снижение активности ферментов антиоксидантной системы, повышение уровня нитрит-иона крови крыс.

2. Димефосфон проявляет противовоспалительный эффект при моделировании хронического аутоиммунного воспаления лап крыс адьювантом Фрейнда.

3. На модели адьювантного артрита димефосфон снижает содержание продуктов перекисного окисле-

ния липидов при повышении активности ферментов антиоксидантной системы.

4. В отличие от ионола димефосфон на модели адьювантного артрита повышает уровень нитрит-иона крови.

5. Ксидифон на модели адьювантного артрита у крыс не проявляет противовоспалительную и антиоксидантную активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Алексеева, Э. А. Юрьева, Е. К. Баландин и др., *Актуальные вопросы фармакотерапии в педиатрии*, Москва (1982), сс. 111 – 115.
2. М. Б. Биленко, *Ишемические и реперфузионные повреждения*, Медицина, Москва (1989).
3. И. Х. Валеева, Л. Е. Зиганшина, *Биохимические методы исследования общих механизмов повреждения и воздействия ксенобиотиков*, Казань (1998).
4. И. Х. Валеева, Л. Е. Зиганшина, З. А. Бурнашова, А. У. Зиганшин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(2), 4 – 43 (2002).
5. И. Х. Валеева, Л. Е. Зиганшина, З. А. Бурнашова, А. У. Зиганшин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(1), 46 – 49 (2003).
6. И. Х. Валеева, Л. Е. Зиганшина, З. А. Бурнашова, А. У. Зиганшин, *Бюл. экспер. биол.*, № 7, 72 – 75 (2003).
7. П. П. Голиков, Н. Ю. Николаева, И. А. Гавриленко и др., *Пат. физиол. и экспер. тер.*, № 2, 6 – 9 (2001).
8. Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньшикова, *Окислительный стресс*, Наука / Интерпериодика (2001).
9. Л. Е. Зиганшина, И. А. Студенцова, И. В. Заиконникова, А. У. Зиганшин, *Фармакол. и токсикол.*, № 1, 57 – 59 (1990).
10. Л. Е. Зиганшина, А. У. Зиганшин, *Казанский мед. журн.*, № 3, 213 – 217 (1997).
11. Л. Е. Зиганшина, И. А. Студенцова, А. У. Зиганшин, И. Х. Валеева, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 2, 43 – 45 (1992).
12. Л. Е. Зиганшина, З. А. Бурнашова, И. Х. Валеева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **63**(6), 39 – 42 (2000).
13. Л. Е. Зиганшина, А. Ф. Султанова (А. Ф. Титаренко), В. Н. Хазиахметова, И. Х. Валеева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(2), 49 – 52 (2002).
14. Л. Е. Зиганшина, А. Ф. Титаренко, И. Х. Валеева, А. У. Зиганшин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(5), 30 – 34 (2003).
15. Ф. П. Тринус, Б. М. Клебанов, В. И. Кондратюк, *Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению нестероидных противовоспалительных фармакологических веществ* (1983).

Поступила 13.04.10

DIMEPHOSPHONE SHOWS ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-OXIDATIVE ACTIVITY ON CHRONIC AUTOIMMUNE INFLAMMATION MODEL

I. H. Valeeva¹, A. F. Titarenko¹, V. N. Khaziakhmetova¹, and L. E. Ziganshina²

¹ Central Research Laboratory, Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, Tatarstan, 420012, Russia

² Department of Clinical Pharmacology and Pharmacotherapy, Kazan State Medical Academy, ul. Mushtari 11, Kazan, Tatarstan, 420012, Russia

The anti-inflammatory activity of dimephosphone, xydiphone (ethidronate), and ionol (dibunol) and their effects on lipid peroxidation (LPO) indices and the activity of antioxidant enzymes in blood were studied on the model of Freund adjuvant induced arthritis in white laboratory rats. The Freund adjuvant induced chronic arthritis and increased the concentrations of PLO products and nitrite ions in the blood plasma. Only dimephosphone showed an anti-inflammatory action. Dimephosphone and ionol inhibited the LPO, whereas xydiphone did not influence the LPO indices in the blood.

Key words: Freund adjuvant, lipid peroxidation, dimephosphone, xydiphone (ethidronate), ionol (dibunol)