

УДК 615.015.21:615.276

**ВЛИЯНИЕ АНТИГИПОКСАНТОВ НА РАЗВИТИЕ
ФОРМАЛИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ****Новиков В.Е., Пожилова Е.В., Маркова Е.О., Илюхин С.А.***ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия МЗ РФ,
Смоленск, e-mail: nau@sgma.info*

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

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

**INFLUENCE OF ANTIHYPOXANTS ON THE DEVELOPMENT
OF PHORMALIN-INDUCED INFLAMMATION****Novikov V.E., Pogilova E.V., Markova E.O., Ilyuchin S.A.***Smolensk State Medical Academy, Smolensk, e-mail: nau@sgma.info*

In the experiment, on a model of acute phormalin-induced inflammation of rat's paw, changes in size of the affected limbs (paw edema) and parameters of leukogram were registered. The anti-inflammatory effect of antihypoxants (amtizol, hesperidin, hypoxen, metaprot) was investigated. It has been shown that hypoxen 50 mg/kg have weak anti-inflammatory activity, but potentiate the effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. At simultaneous enteral administration of hypoxen 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.

Лекарственные вещества с антигипоксическими и антиоксидантными свойствами сегодня широко применяются в медицинской практике [1, 3, 6, 9]. Пристальное внимание к антигипоксантам обусловлено многообразным метаболотропным действием данной группы препаратов. В основе их фармакодинамики лежат различные метаболические механизмы, включая регуляцию потребления кислорода и энергетический обмен, воздействие на процессы свободно-радикального окисления и проницаемость клеточных мембран, влияние на регуляторные факторы клеточной адаптации и другие процессы [5, 8]. В научной литературе имеются сведения о противовоспалительной активности антигипоксантов и возможности их применения в лечении воспалительных заболеваний [2, 7].

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, представляющих серьезную угрозу для жизни. Среди перспективных путей повышения эффективности и безопасности НПВС рассматривается, в частности, их комбинированное использование с антигипоксантами/антиоксидантами [4].

Целью настоящей работы явилось изучение противовоспалительной активности антигипоксантов различного химического строения и их влияние на эффективность НПВС при остром экспериментальном воспалении.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Wistar массой 180–220 г. Острую воспалительную реакцию воспроизводили путем субплантарного введения 0,1 мл 2% водного раствора формалина в левую заднюю лапу опытным группам крыс. Контрольным животным вводили равный объем воды очищенной. В работе изучены вещества с антигипоксантами 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-дигидроксифенилен}-]4-тиосульфокислоты) и метапрот (2-этилтиобензимидазол гидробромид), которые вводили в дозе 50 мг/кг. Препараты сравнения – ацетилсалициловая кислота (АСК) в дозе 100 мг/кг и диклофенак натрия в дозе 8 мг/кг. Все лекарственные вещества вводили в виде водных растворов зондом в желудок за 1 час до индукции воспаления. При комбинированном применении вещества вводили с интервалом 1 час.

Величину отека измеряли онкометрическим методом по изменению объема конечности экспериментальных животных [10]. Объем конечностей животных измеряли до введения и через 3 часа после введения формалина. В качестве критериев оценки противовоспалительной эффективности антигипок-

сантов и НПВС использовались: прирост объема конечности и торможение воспаления. Прирост объема конечности рассчитывали по формуле:

$$П = \frac{O - И}{И} \times 100 \%,$$

где П – прирост отека;

O – величина объема лапы после введения индуктора воспаления;

И – величина объема лапы до введения индуктора воспаления.

Торможение воспаления рассчитывали по формуле:

$$100\% - \left(\frac{O - И}{И} (o) \div \frac{O - И}{И} (к) \right) \cdot 100 \%,$$

где o – леченные животные (опытные);

к – группа формалина.

Затем животных декапитировали под легким эфирным наркозом. В момент декапитации животных осуществляли забор крови. Подсчет лейкограммы проводили общепринятым методом [2]. По данным лейкограммы производили расчет агранулоцитарно/

гранулоцитарного индекса (I_{agr} – индекс противовоспалительной активности), представляющего собой отношение суммарных показателей агранулоцитов (лимфоциты и моноциты) и гранулоцитов (нейтрофилы и эозинофилы). Агранулоцитарно/гранулоцитарный индекс рассчитывали по формуле: $I_{agr} = \frac{\sum \text{агранулоциты}}{\sum \text{гранулоциты}}$.

Статистическую обработку результатов опытов проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica Version 6.0

Результаты исследования и их обсуждение

Через 3 часа после субплантарного введения формалина у крыс развивался выраженный отек пораженной конечности, объем которой существенно увеличивался и составлял $2,24 \pm 0,03 \text{ см}^3$ ($p < 0,05$), что на 52,4% больше исходного объема. У контрольных животных объем лапы не изменялся (табл. 1).

Таблица 1

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

Группы животных, (n = 10)	Доза, мг/кг	Объем лапы, см ³ , (M ± m)		Прирост объема, %	Торможение воспаления, %
		До введения	После введения		
Контроль		1,43 ± 0,05	1,44 ± 0,06		
Формалин		1,47 ± 0,05	2,24 ± 0,03*	52,4	
Антигипоксанты + формалин					
Гипоксен	50	1,41 ± 0,02	1,99 ± 0,01*#	41,1	21,6
Метапрот	50	1,47 ± 0,02	2,14 ± 0,02*	45,6	13,0
Амтизол	50	1,41 ± 0,04	2,07 ± 0,05*	46,8	10,6
Гесперидин	50	1,32 ± 0,06	1,95 ± 0,05*	47,7	8,9
НПВС + формалин					
АСК	100	1,55 ± 0,04	1,88 ± 0,02*#	21,3	59,3
Диклофенак	8	1,46 ± 0,03	1,61 ± 0,03#	10,3	80,3
Антигипоксанты + НПВС + формалин					
Гипоксен + АСК	50 100	1,48 ± 0,02	1,63 ± 0,02#	10,1	80,7
Гипоксен + Диклофенак	50 8	1,43 ± 0,02	1,52 ± 0,02#	6,3	88,0
Метапрот + АСК	50 100	1,33 ± 0,05	1,65 ± 0,05#	24,0	54,2
Метапрот + Диклофенак	50 8	1,45 ± 0,02	1,59 ± 0,03#	9,6	81,7
Амтизол + АСК	50 100	1,38 ± 0,03	1,69 ± 0,04*#	22,4	57,2
Гесперидин + АСК	50 100	1,33 ± 0,04	1,63 ± 0,03*#	22,5	57,0

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

На фоне введения гипоксена объем конечности увеличился по сравнению с контрольной группой животных на 41,1%, что было достоверно меньше, чем в опытной

группе с формалином. Торможение воспаления гипоксеном составило 21,6%. Предварительное введение метапрота было менее эффективно (торможение воспаления

13,0%). Амтизол и гесперидин не оказали статистически значимого влияния на развитие формалинового 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 21,3% и 10,3%), а торможение воспаления составило 59,3 и 80,3% соответственно по сравнению с группой, где применялся формалин.

При комбинированном применении гипоксена с АСК или с диклофенаком для коррекции воспаления отмечено минимальное увеличение объема конечности, причем данные показатели существенно не отличались от значений контрольной группы, а торможение воспаления составило 80,7 и 88,0%. Применение метапрота, амтизола

и гесперидина в комбинации с НПВС не отличалось по выраженности воспалительного отека от монотерапии только НПВС.

Из приведенных результатов следует, что гипоксен уменьшает развитие формалин-индуцированного отека конечности. При комбинированном применении антигипоксанта с АСК или диклофенаком он потенцирует противовоспалительный эффект НПВС.

Результаты исследования лейкограммы экспериментальных животных представлены в табл. 2. Из таблицы следует, что во всех опытных группах животных введение формалина вызывало относительную нейтрофилию с увеличением процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов на фоне общего лейкоцитоза. Такие изменения в лейкоцитарной формуле характерны для острого воспалительного процесса.

Таблица 2

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

Группы животных (n = 10)	Доза мг/кг	Лейкограмма крови крыс					I _{a/g} усл. ед.
		Нейтрофилы		Эозинофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %	
		Палочкоядерные, %	Сегментоядерные, %				
Контроль		0,6 ± 0,21	22,4 ± 0,26	1,7 ± 0,03	1,8 ± 0,17	73,5 ± 3,51	3,08 ± 0,26
Формалин		1,1 ± 0,06*	44,2 ± 2,66*	0,8 ± 0,04*	4,7 ± 0,02*	49,2 ± 3,66*	1,17 ± 0,05*
Антигипоксанты + формалин							
Гипоксен	50	1,0 ± 0,05*	39,9 ± 3,06*	0,7 ± 0,01*	4,6 ± 0,08*	53,8 ± 3,42*	1,41 ± 0,09*#
Метапрот	50	1,0 ± 0,04*	40,4 ± 2,21*	0,7 ± 0,03*	4,7 ± 0,05*	53,2 ± 3,57*	1,38 ± 0,10*#
Амтизол	50	1,1 ± 0,03*	43,1 ± 2,68*	0,8 ± 0,01*	4,8 ± 0,04*	50,2 ± 3,58*	1,23 ± 0,10*
Гесперидин	50	1,0 ± 0,02*	42,3 ± 3,02*	0,7 ± 0,01*	4,8 ± 0,05*	51,2 ± 3,19*	1,28 ± 0,07*
НПВС + формалин							
АСК	100	0,7 ± 0,07#	35,1 ± 3,81*#	0,9 ± 0,05*	3,6 ± 0,03*#	59,7 ± 4,24*#	1,73 ± 0,13*#
Диклофенак	8	0,7 ± 0,06#	28,6 ± 2,86*#	1,2 ± 0,02*#	2,6 ± 0,06*#	66,9 ± 4,22#	2,31 ± 0,23#
Антигипоксанты + НПВС + формалин							
Гипоксен + АСК	50 100	0,6 ± 0,04#	33,2 ± 2,56*#	0,9 ± 0,06*	2,7 ± 0,06*#	62,6 ± 3,60#	1,89 ± 0,14#
Гипоксен + Диклофенак	50 8	0,6 ± 0,05#	24,6 ± 2,71#	1,5 ± 0,07#	2,3 ± 0,04#	71,0 ± 4,54#	2,77 ± 0,24#
Метапрот + АСК	50 100	0,7 ± 0,02#	38,4 ± 1,36*#	1,3 ± 0,04#	3,3 ± 0,03*#	56,3 ± 2,69*#	1,48 ± 0,12*#
Метапрот + Диклофенак	50 8	0,6 ± 0,01#	26,4 ± 1,54#	1,5 ± 0,07#	3,3 ± 0,08*#	68,2 ± 3,84#	2,54 ± 0,27#
Амтизол + АСК	50 100	0,7 ± 0,01#	44,0 ± 2,23*	1,0 ± 0,02*	3,3 ± 0,03*#	51,0 ± 2,67*	1,19 ± 0,07*#
Гесперидин + АСК	50 100	0,7 ± 0,01#	45,0 ± 2,15*	0,9 ± 0,01*	3,5 ± 0,03*#	49,9 ± 4,15*	1,16 ± 0,12*

При введении формалина количество зрелых форм нейтрофилов в крови животных возросло до 44,2 ± 2,66%, количество моноцитов до 4,7 ± 0,02%, количество лимфоцитов и эозинофилов снизилось до 49,2 ± 3,66% и 0,8 ± 0,04% (p < 0,05). На

фоне введения АСК и диклофенака изменения были менее выражены – количество зрелых форм нейтрофилов увеличилось до 35,1 ± 3,81% и 28,6 ± 2,86%, моноцитов до 3,6 ± 0,03% и 2,6 ± 0,06%, а количество эозинофилов (0,9 ± 0,05%

и $1,2 \pm 0,02\%$) и лимфоцитов ($59,7 \pm 4,24\%$ и $66,9 \pm 4,22\%$) оставалось сниженным. Антигипоксанты оказали слабое влияние на показатели лейкограммы, которые приближались к значениям группы без фармакологической коррекции.

При комбинированном применении гипоксена с АСК и диклофенаком отмечены минимальные изменения лейкограммы по сравнению с контрольной группой: количество нейтрофилов увеличилось до $33,2 \pm 2,56\%$ и $24,6 \pm 2,71\%$, моноцитов до $2,7 \pm 0,06\%$ и $2,3 \pm 0,04\%$, количество эозинофилов снизилось до $0,9 \pm 0,06\%$ и $1,5 \pm 0,07\%$, а количество лимфоцитов приближалось к контрольным значениям. На фоне комбинации метапрота с диклофенаком так же отмечены незначительные изменения лейкограммы. Комбинированное применение метапрота, амтизола и гесперидина с АСК существенно не изменяло показатели лейкограммы на фоне воспаления, индуцированного формалином, по сравнению с опытной группой, получавшей одну АСК.

Для интегрированной оценки противовоспалительной активности антигипоксантов и их комбинаций с НПВС был рассчитан индекс противовоспалительной активности (табл. 2). Наибольшее значение индекса отмечено в контроле – 3,08. При воспалении индекс уменьшается до 1,17. На фоне применения препаратов антигипоксантов и НПВС наблюдается различная противовоспалительная активность, что видно не только по изменению объема конечности, но и по изменению индекса $I_{a/r}$. Наиболее эффективными оказались комбинации гипоксена с диклофенаком ($I_{a/r} = 2,77 \pm 0,24$), метапрота с диклофенаком ($I_{a/r} = 2,54 \pm 0,27$), гипоксена с АСК ($I_{a/r} = 1,89 \pm 0,14$). При сравнении прироста объема конечности с индексом $I_{a/r}$ отмечено, что между данными показателями имеется обратная корреляционная зависимость (при $r = -0,96$, $p < 0,05$).

Таким образом, субплантарное введение 2% водного раствора формалина крысам вызывает через 3 часа развитие острой воспалительной реакции, которая проявляется выраженным отеком (увеличение объема лапы) пораженной конечности и характерными изменениями лейкограммы крови. Предварительное энтеральное введение опытным животным антигипоксантов (амтизол, гесперидин, гипоксен, метапрот) существенно не изменяет развитие воспалительной реакции. Слабое противовоспалительное действие оказывает гипоксен в дозе 50 мг/кг. Применение гипок-

сена в комбинации с ацетилсалициловой кислотой или диклофенаком при остром формалин-индуцированном воспалении сопровождается выраженным увеличением противовоспалительного эффекта НПВС. У животных, получавших эти комбинации лекарственных веществ на фоне введения формалина, регистрируемые признаки воспаления (прирост объема конечности, процент торможения воспаления, показатели лейкограммы) были значительно меньше, а индекс противовоспалительной активности выше по сравнению с другими опытными группами животных. Менее эффективной оказалась комбинация метапрота с диклофенаком. Данные результаты свидетельствуют о том, что гипоксен и в меньшей степени метапрот потенцируют противовоспалительный эффект НПВС. Возможно, это связано с мощным антиоксидантным действием препаратов и подавлением эксудативной фазы воспаления [1, 2].

Выводы

Гипоксен в дозе 50 мг/кг оказывает слабое противовоспалительное действие на модели острого формалин-индуцированного воспаления. Применение гипоксена в комбинации с диклофенаком или ацетилсалициловой кислотой потенцирует противовоспалительный эффект НПВС.

Список литературы

1. Левченкова О.С., Новиков В.Е., Пожилова Е.В. Фармакодинамика и клиническое применение антигипоксантов // *Обзоры по клинич. фармакологии и лек. терапии.* – 2012. – Т. 10, № 3. – С. 3–12.
2. Новиков В.Е., Илюхин С.А. Влияние гипоксена на эффективность кислоты ацетилсалициловой при остром воспалении // *Эксперим. и клинич. фармакология.* – 2013. – Т. 76, № 4. – С. 32–35.
3. Новиков В.Е., Климкина Е.И. Фармакология гепатопротекторов // *Обзоры по клинич. фармакологии и лек. терапии.* – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 2–20.
4. Новиков В.Е., Крюкова Н.О., Новиков А.С. Гастропротекторные свойства мексидола и гипоксена // *Эксперим. и клинич. фармакология.* – 2010. – Т. 73, № 5. – С. 15–18.
5. Новиков В.Е., Левченкова О.С. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени для их действия // *Эксперим. и клинич. фармакология.* – 2013. – Т. 76, № 5. – С. 37–47.
6. Новиков В.Е., Маслова Н.Н. Влияние мексидола на течение посттравматической эпилепсии // *Эксперим. и клинич. фармакология.* – 2003. – Т. 66, № 4. – С. 9–11.
7. Тургенева Л.Б., Новиков В.Е., Пожилова Е.В. Лечение воспалительных заболеваний пародонта мексидолом // *Патогенез.* – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 67.
8. Ураков А.Л. Как действуют лекарства внутри нас. – Ижевск: Удмуртия, 1996. – 125 с.
9. Ураков А.Л. Основы клинической фармакологии. – Ижевск: Ижевский полиграфкомбинат, 1997. – 164 с.
10. Fereidoni M., Ahmadiani A., Semnianian S., Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema // *Pharm. Toxicol. Methods J.* – 2000. – Vol. 43. – P. 11–14.