

Н.І. Волощук

СТАТЕВИЙ ДИМОРФІЗМ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТА ТОКСИЧНОСТІ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ У ЩУРІВ З АД'ЮВАНТНИМ АРТРИТОМ

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова
кафедра фармакології
(зав. – д. мед. н., проф. Г.І. Степанюк)

Ключові слова: *статеві відмінності, диклофенак натрію, ад'ювантний артрит, токсичність, щури*
Key words: *sexual differences, diclophenac-sodium, adjuvant arthritis, toxicity, rats*

Резюме. *В опытах на самцах и самках крыс с ад'ювантным артритом было установлено, что аутоиммунный процесс существенно повышает анальгезирующий эффект, гастро- и нефротоксичность диклофенака натрия у животных обоего пола. Выявленные ранее половые различия фармакодинамики с превалированием силы и длительности антиноцицептивного и антифлогогенного эффекта и меньшей токсичности у самок крыс по сравнению с самцами, которые имеют место у интактных животных, при моделировании воспалительного процесса сохраняются.*

Summary. *In the experiments on rats of both sexes with adjuvant arthritis it was determined that autoimmune process significantly increases analgesic effect, gastro- and nephrotoxicity of diclophenac sodium. Previously revealed sex differences of pharmacodynamics with predominance of force and persistence of antinociceptive and antiphlogogenic effect and less toxicity in female rats as compared to male rats, occurring in intact animals in modeling of inflammatory process, persist.*

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) є добре відомими і широко вживаними лікарськими засобами. За більш ніж 100-літній період від початку їх застосування масштаби регулярного використання цих препаратів охоплюють близько 26% населення нашої планети. Щоденно певні НПЗП приймають 40 млн осіб, причому приблизно в 1/3 випадків – безрецептурно [1, 11]. Одним з найбільш ефективних препаратів цієї групи є лікарський засіб «золотого стандарту» диклофенак натрію, який використовують як високоефективний анальгетик та протизапальний засіб як у ревматології, так і в загальноклінічній практиці. Широке використання цього препарату обмежується ризиком виникнення побічних реакцій з боку шлунково-кишкового тракту, нирок, печінки тощо. Тому всебічне вивчення чинників, які можуть посилювати або зменшувати фармакологічну активність диклофенаку і покращити профіль безпечності цього засобу та його місце в раціональній фармакотерапії, є доцільним та необхідним. Одним із таких факторів є стать. Як відомо, існування статевих відмінностей у фармакологічному ефекті описане для антигістамінних препаратів, серцевих глікозидів, діуретиків, блокаторів кальцієвих каналів, наркотичних анальгетиків та деяких інших засобів [12, 13]. Питання статевих диморфізму фармакодинаміки НПЗП залишається остаточно не з'ясованим.

Деякі відомості щодо впливу статі на фармакодинаміку препаратів із протизапальною та знеболювальною активністю описані в літературі, проте вони частіше стосуються небажаних та токсичних ефектів цих засобів та часто є протирічними [7, 9, 10].

Метою нашої роботи було дослідження статевих диморфізму в анальгезуючій і протизапальній активності та токсичності диклофенаку натрію у щурів з ад'ювантним артритом у порівнянні з інтактними тваринами.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проведені на 82 самцях і самках білих нелінійних статевозрілих щурів віварію Вінницького національного медичного університету. Під час дослідів тварини знаходились на традиційному раціоні з 12-годинним світлотіньовим режимом та вільним доступом до води та їжі. В дослід самок брали в фазі проеструсу, який визначали за допомогою вагінальних мазків. Гендерні відмінності у фармакологічному ефекті диклофенаку натрію («Вольтарен», Novartis) досліджували як у інтактних тварин, так і на моделі ад'ювантного артрити (АА), який відтворювали введенням під підшкірний апоневроз задньої лапи 0,1 мл ад'юванта Фрейнда (2 частини вазеліну, одна частина ланоліну та вбита вакцина БЦЖ з розрахунку 5 мг/мл). Дослідження проводили на 14-й день розвитку АА, на піку розвитку реактивного запального процесу.

Знеболювальний ефект оцінювали на моделі подразнення електричним струмом, що генерувався за допомогою апарату ЭСЛ-1 (частота 100 Гц, тривалість 5 мсек і затримка 5 мсек). За поріг больової чутливості (ПБЧ) приймали найменшу силу електричного струму (у вольтах), що викликала больове відчуття у тварини (вокалізацію болі і/або відсмикування лапок від токопровідної поверхні дна камери) [3]. Порівнювали вихідні показники ПБЧ з такими через 1, 2, 4, 6 та 8 годин після введення диклофенаку (10 мг/кг одноразово внутрішньошлунково).

Гендерні відмінності протизапальної дії диклофенаку натрію оцінювали шляхом вимірювання товщини ушкодженої кінцівки у щурів за допомогою лабораторного мікрометра. Дослідження проводились у самок і самців інтактних щурів на моделі карагенінового набряку [4]. Диклофенак (10 мг/кг у шлунок на 1% розчині крохмалю) вводили за 1 годину до ін'єкції карагеніну. Протинабрякову активність диклофенаку визначали в порівнянні з контрольними тваринами (яким вводили еквівалентну кількість розчинника). Відмінності в протизапальній активності диклофенаку натрію у щурів обох статей визначались також за змінами товщини ушкодженої кінцівки у тварин з АА, лікованих диклофенаком (10 мг/кг внутрішньошлунково 1 раз на день, починаючи з 1-го дня моделювання патологічного процесу) в порівнянні з нелікованими тваринами.

Ульцерогенну та нефротоксичну дію препара-

ту вивчали після його 7-денного введення в дозі 5 мг/кг у щурів групи контролю та у тварин з АА. Стан слизової шлунку оцінювали візуально, ступінь пошкодження оцінювали в балах. Визначали множинність, важкість виразкоутворення та виразковий індекс [4]. Для оцінки функціонального стану нирок визначали активність гамма-глутамілтрансферази (ГГТФ), рівень білку та креатиніну в сечі та креатиніну в сироватці крові уніфікованими методами [6]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили в Microsoft Excel за допомогою стандартних статистичних програм, використовуючи середні величини, стандартне відхилення ($M \pm m$), t-критерій Стьюдента. Вірогідність відмінностей вважали при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень було встановлено, що самці та самки інтактних щурів суттєво відрізняються за величиною як протизапальної, так і знеболювальної дії диклофенаку натрію (табл.1). Більш виразна анальгезуюча дія була зареєстрована у самок. Так, ПБЧ у тварин цієї статі практично у всі терміни дослідження виявився вищим, ніж у самок. Особливо виразне переважання дії диклофенаку у тварин жіночої статі було зареєстровано на 4-й, 6-й та 8-й годині після введення препарату. Протинабрякова дія препарату на моделі карагенінового набряку також була більш виразною у самок (69,11% проти 58,65% у самців).

Таблиця 1

Знеболювальний та протизапальний ефект диклофенаку натрію у самок та самців щурів ($M \pm m$)

	Самці, n = 7-10	Самки, n = 7-10
	Інтактні щурі	
Протинабрякова активність	58,65%	69,11%*
Знеболювальний ефект	Поріг больової чутливості, % до вихідного рівня	
Через 1 годину	16,8±4,29	26,1±2,99
Через 2 години	29,2±3,08	38,9±2,97*
Через 4 години	18,4±2,42	36,8±4,24*
Через 6 годин	7,40±2,51	21,0±3,97*
Через 8 годин	3,72±1,25	11,2±2,25*
	Ад'ювантний артрит	
Протинабрякова активність	27,68%	37,92%*
Знеболювальний ефект	Поріг больової чутливості, % до вихідного рівня	
На 14-й день АА	-23,44±2,30	-36,82±2,21*
Через 1 годину	30,30±3,57	46,8±3,03*
Через 2 години	56,80±3,01	83,1±1,59*
Через 4 години	37,10±1,42	74,8±3,51*
Через 6 годин	19,39±1,31	60,3±3,59*
Через 8 годин	9,96±1,51	34,4±1,59*

Примітка: * – статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між самцями і самками

Введення тваринам ад'юванту Фрейнда на 14-й день викликало зниження вихідного ПБЧ у тварин обох статей, проте у самок щурів посилення ноцицепції було більш суттєвим (на 36,8%) у порівнянні з 23,4% у самців, у той час як у інтактних щурів вірогідних відмінностей у вихідному рівні ПБЧ не було. Індукція аутоімунного запального процесу у щурів значно посилювала ступінь анальгезуючої дії диклофенаку натрію як у самок, так і у самців піддослідних тварин. На 2-й, 4-й, 6-й та 8-й годині експерименту ПБЧ у самців збільшувався в 1,9, 2,0, 2,6 та 2,7 рази відповідно, в той час як виразність антиноцицептивного ефекту диклофенаку у самок зростала в аналогічні терміни дослідження відповідно в 2,1, 2,0, 3,1 та 3,4 рази. Звертає на себе увагу той факт, що вектор гендерних відмінностей в динаміці знеболювального ефекту диклофенаку при ад'ювантному артриті зберігався, тобто антиноцицептивна дія у самок була сильнішою та тривалішою, ніж у самців, проте на тлі запального процесу виразність цих переважань анальгезії у тварин жіночої статі дещо посилювалось. Так, у тварин з АА на 2, 4, 6 та 8 годину експерименту знеболювальна дія препарату у самок переважала таку у самців відповідно в 1,4, 2,0, 3,1 та 3,4 рази проти 1,3, 2,0, 2,8 та 3,0 рази у інтактних тварин. У тварин з АА також зберіглися статеві відмінності у проти-запальній дії досліджуваного препарату. Так, протинабрякова активність диклофенаку у самців щурів становила лише 27,68%, в той час як у тварин протилежної статі цей показник був вірогідно більшим (37,92%).

Причини, які лежать в основі виявлених нами статевих відмінностей у фармакологічному ефекті досліджуваного НПЗП, можуть бути пов'язаними із секс-специфічними детермінантами механізмів дії препаратів цієї групи. Так, описаний статевий поліморфізм активності циклоогсигенази-2, з переважанням кількості цього ензиму у самок [16]. Крім інгібування ЦОГ, індукція якої в умовах запального процесу до певної міри пояснює посилення фармакологічного ефекту диклофенаку у всіх тварин, у механізмах дії НПЗП лежить здатність впливати на опіоїдні та NMDA-рецептори, концентрація і розподіл яких показують чітку статеву відмінність [13, 17], що може бути одними з причин відмінностей у сприйнятті больового відчуття та реакції на нестероїдні протизапальні і анальгезуючі засоби. Ще одним фактором є секс-

специфічна експресія ксенобіотик-метаболізуючих, у тому числі ферментів цитохрому P450 [15]. Відомо, що основними метаболізаторами НПЗП у печінці є підродина цитохромів P450 2C [14]. У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що у самців інтактних щурів загальний вміст цитохрому P450 та маркерні активності CYP2C (амідопірин-N-деметилазна та напроксен-O-деметилазна) в мікросомах печінки перевищують такі у самок [2]. Це приводить до більш швидкого перетворення активної форми препарату у самців до його метаболітів, які практично позбавлені фармакологічної активності, що в певній мірі пояснює меншу силу та тривалість антиноцицепції. В той же час статистично менша загальна кількість цитохрому P450 та маркерні активності відповідних ферментів у інтактних самок до певної міри можуть пояснити більш виразну та тривалу дію диклофенаку у тварин цієї статі. Запальний процес приводить до зменшення кількості цитохрому P450 та більшості маркерних активностей, в т.ч. CYP2C [8], тому в умовах ад'ювантного артрити сповільнювалась метаболічна інактивація диклофенаку у тварин обох статей, його анальгетична дія посилювалась і подовжувалась. Проте, як свідчать наші дані (табл.1), виявлені гендерні відмінності фармакологічного ефекту в інтактних тварин зберігались і на моделі запального процесу.

В наступній частині роботи ми досліджували можливий вплив запального процесу на токсичність диклофенаку натрію у самців і самок щурів. Було встановлено, що ульцерогенна дія досліджуваного НПЗП була більш виразною у самців щурів у порівнянні з самками. На користь цього свідчить те, що множинність виразкоутворення в інтактних самців в 1,7 рази, а тяжкість – на 32,7% перевищували такі в інтактних самок (табл. 2). Виразковий індекс диклофенаку у самців був в 1,5 рази більшим порівняно з самками. Ад'ювантний артрит посилював ульцерогенну дію препарату у тварин обох статей: множинність, тяжкість виразкоутворення та виразковий індекс у самців вірогідно підвищувались на 26,5, 10,7 та 6,4% відповідно, в той час як у самок це підвищення становило 21,6, 7,3 та 3,1% , не досягаючи при цьому статистично вірогідних значень. У той же час переважання ульцерогенності диклофенаку у тварин чоловічої статі зберігалось.

Вплив запального процесу на статевий диморфізм ульцерогенної дії диклофенаку натрію у щурів (M±m; n = 10-15)

Група 2 Інтактні + диклофенак			Група 3 Ад'ювантний артрит + диклофенак		
множинність	тяжкість	виразковий індекс	множинність	тяжкість	виразковий індекс
Самці					
21,1±1,12	1,99±0,04	4,7	26,7±1,15#	2,19±0,07#	5,0
Самки					
12,5±0,83*	1,50±0,03*	3,2	15,2±1,16*	1,61±0,10*	3,3

Примітка: * – статистично вірогідні відмінності між самцями і самками (p<0,05); # – статистично вірогідні відмінності в порівнянні з інтактними тваринами відповідної статі (p<0,05)

Аналогічна тенденція була зафіксована і при дослідженні нефротоксичної дії диклофенаку натрію у самців та самок щурів. Як видно з таблиці 3, навіть у інтактних тварин існують статеві відмінності в роботі як клубочкового, так і канальцевого апарату видільних органів. Так, самці відрізняються дещо вищою протеїнурією та ензимурією та більшим вмістом креатиніну в сироватці крові, ніж самки. Диклофенак проявляв більш виразну нефротоксичну дію саме у тварин чоловічої статі, підвищуючи екскрецію білку в 3,3 разу (проти 3,0 разу у самок), що супроводжувалось збільшенням активності ГГТФ в 4,1 разу (проти 3,7 разу у самок), а також

підвищенням на 32,9% концентрації креатиніну крові проти 25,2% у тварин протилежної статі. Нефротоксична, як і гастротоксична дія диклофенаку натрію у тварин з АА також зростала. Екскреція з сечею білка та гамма-глутамілтрансферази під впливом диклофенаку натрію у самців щурів з АА зростала в 1,5 та 1,7 разу, а у самок щурів з АА лише в 1,3 та 1,4 разу відповідно. Підвищення креатиніну в сироватці крові у самців з АА також було більш суттєвим, ніж у самок. Тобто, ад'ювантний артрит посилював токсичність досліджуваного НПЗП, гендерні відмінності при цьому зберігались.

Таблиця 3

Вплив запального процесу на статевий диморфізм нефротоксичної дії диклофенаку натрію у щурів (M±m; n = 10-15)

	Група 1 Інтактний контроль		Група 2 Інтактні + диклофенак		Група 3 АА + диклофенак	
	самці	самки	самці	самки	самці	самки
Білок сечі, мг за 8 годин	5,37±0,32	3,80±0,21*	17,7±1,04	11,4±1,01*	26,1±0,70	15,4±0,42*
ГГТФ сечі нмоль/хв/мл	1,08±0,10	0,75±0,07*	4,43±0,42	2,80±0,25*	6,51±0,47	3,84±0,31*
Креатинін сироватки мкмоль/л	62,6±3,01	59,9±3,18	83,2±3,51	75,0±3,96	105,6±4,63	91,9±1,49*

Примітка: * – позначено статистично вірогідні відмінності між самцями і самками (p<0,05)

Виявлене нами підвищення токсичності диклофенаку натрію у тварин з ад'ювантним артритом, на нашу думку, може бути наслідком збільшення вмісту незміненої форми препарату, яка володіє анальгезуючим ефектом і досить суттєвою токсичністю внаслідок сповільнення метаболічної інактивації його в умовах запального процесу, що приводить до більш виразного прояву характерних токсичних ефектів нестероїдного протизапального засобу.

ПІДСУМОК

Таким чином, проведені дослідження показали, що автоімунний запальний процес здатен суттєво підвищувати фармакологічний ефект і токсичність диклофенаку натрію у тварин обох статей, в більшій мірі – у самців. Гендерні відмінності з переважанням сили та тривалості антиноцицептивної та антифлогогенної дії та менш виразної токсичності у самок у порівнянні з самцями, які мають місце в інтактних тварин, при моделюванні запального процесу зберігаються.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Викторов А.П. Побочное действие современных нестероидных противовоспалительных препаратов: проблемы остаются? // Украинский медицинский часопис. – 2003. - №1(33). – С.79-89.
2. Волощук Н.И., Пентюк А.А., Дурнев А.Н. Половые различия антиноцицептивного эффекта некоторых ненаркотических анальгетиков у крыс: роль биотрансформации / Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. - №4. – С.56-60.
3. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ - М.: Медицина, 1974. – 142 с.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: ВД «Авіцена», 2001. – 527 с.
5. Карузина И.И., Арчаков А.И. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977.- С.49-62.
6. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В.Меньшикова.- М.: Медицина, 1987.- 368 с.
7. Насонов Е.Л. НПВП при ревматических заболеваниях // Новые медицинские технологии. – 2002. - №1. – С. 38-43.
8. Петровська Г.П., Пентюк О.О. Гальмування процесів біотрансформації ксенобіотиків при ад'ювантному артриті. Зв'язок з активністю запального процесу та оксидативним і нітрозактивним стресом / // Медична хімія. - 2005. - Т.7, №2. - С.5-9.
9. Свинцицкий А.С., Пузанова О.Г. Гастроуденальные осложнения противовоспалительной терапии в ревматологической практике / // Украинский ревматологический журнал. – 2002. - №2(8). – С. 15-23.
10. Шварц Г. Я. Анализ основных факторов риска гастротоксичности современных нестероидных противовоспалительных средств // Украинский ревматологический журнал. – 2007.– Т.29, №3. – С. 52-57.
11. Швець Н.И., Бенца Т.С. Осложнения со стороны пищеварительного тракта, вызванные приемом нестероидных противовоспалительных препаратов. Часть I. Эпидемиология, механизмы развития, оценка гастроинтестинального риска, значение *Helicobacter pylori* // Украинский медицинский часопис. – 2002. - №6 (32). - С. 46-51.
12. Adverse drug reactions as cause of hospital admissions: results from the Italian Group of Pharmacoepidemiology in the Elderly (GIFA) / G. Onder, C. Pedone, F. Landi et al. // J. Am. Geriatr. Soc. – 2002. – Vol. 50, N12. – P.1962-1968
13. Davis W.M., Pharm B.S. Impact of gender on drug responses // Drug topics. - 1998. – P. 91-100
14. Goldstein J.A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2001. – Vol. 52, N4. – P.349 - 355.
15. Mode A., Ahlgren R., Lahuna O. Gender differences in rat hepatic CYP2C gene expression--regulation by growth hormone // Growth Horm. IGF Res. – 1998. - Suppl B. – P.61-67.
16. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice / L. R. Ballou, R. M. Botting, S. Goorha S. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. - Vol. 97, N18. – P. 10272-10276.
17. Sex-specific expression of N-methyl D-aspartate receptor (NMDAR) in the preoptic area of neonatal rats / C. Hsu, Y. L. Hsieh, S.I. Lue et al. // Neurosci Lett. – 1999. – Vol. 262, N2. – P.85-88.

