



Е.А. Подплетняя, Л.И. Кучеренко, В.И. Мамчур, В.Ю. Слесарчук, М.И. Стефаник

### БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СИНЕРГИЗМА КОМПОНЕНТОВ ПРЕПАРАТА «ИНДОТРИЛ»

Днепропетровская государственная медицинская академия, Запорожский государственный медицинский университет, НПО «Фарматрон»

**Ключові слова:** *індотрил, індометацин, тиотриазолін, біль, простагландини, перекисне окислення ліпідів.*

**Ключевые слова:** *индотрил, индометацин, тиотриазолин, боль, простагландини, перекисное окисление липидов.*

**Key words:** *Indotril, Indometacin, Thiotriazolin, pain, prostaglandins, lipid peroxydation.*

У роботі представлені результати біохімічних досліджень з'єднань мозку (кора, стовбур, гіпокамп) щодо активності ферментативного та неферментативного окислення арахідонової кислоти. Виявлено, що комбінований засіб «Індотрил», складовими частинами якого є нестероїдний протизапальний засіб індометацин та антиоксидант тиотриазолін, має найбільш виражений вплив на концентрацію простагландіна E2 та інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів.

В работе представлены результаты биохимических исследований соединений мозга (кора, ствол, гиппокамп) к активности ферментативного и неферментативного окисления арахидоновой кислоты. Установлено, что комбинированный препарат «Индотрил», составными частями которого являются нестероидный противовоспалительный препарат индометацин и антиоксидант тиотриазолин, имеет наиболее выраженное влияние на концентрацию простагландина E2 и интенсивность процессов перекисного окисления липидов.

There are results of investigation of arachidonic acid's enzymatic and nonenzymatic oxidation of rats brain cortex, hippocamp and medulla are presented in this article. It was elucidated that combined drug "Indotril" (consists nonsteroidal anti-inflammatory drug Indometacin and antioxidant Thiotriazolin) occurs the most visible influence on prostaglandin E2 concentration and intensity of lipid peroxydation.

Благодаря расширению возможностей детального исследования фармакодинамических и фармакокинетических особенностей лекарственных препаратов, перспективным и экономически выгодным путем создания новых лекарственных средств может считаться комбинирование нескольких веществ с необходимым фармакологическим профилем. В последнее время большой интерес у исследователей вызывает изучение непростагландиновой активности классических и вновь созданных нестероидных противовоспалительных средств (НПВС): влияние на синтез цитокинов, лейкотриенов, активных форм кислорода, активность калликреин-кининовой системы, i-NOS и т.д. [1].

Индометацин, обладающий мощным противовоспалительным и анальгезирующим действием, и в то же время далеко небезопасный (гастротоксичность, нефротоксичность, гепатотоксичность и др.), производится во многих странах: индоцин (MSD, США), мобилан (Galen, США), осмогит (Merck-Frosst, Канада), метиндол (Polfa, Польша), индоцид (MSD, Франция), аргун (Merckle GMBH, Германия), индометацин Берлин-Хеми (Berlin-Chemie, Германия), индометацин (Chinoïn, Венгрия), индометацин-Акри (Акрихин, Россия), индометацин (Здоровье, Дарница, Украина) и т.д.

Созданный недавно фиксированный комбинированный препарат «Индотрил», сочетающий в себе индометацин (в дозе, равной 1/2 оптимальной анальгетической) и антиоксидант тиотриазолин, имеет целый ряд преимуществ перед индометацином. Так, у нового лекарственного средства в разных модельных условиях обнаружена выраженная противовоспалительная и анальгетическая активность, которая выше, чем у индометацина [2-4]. Также «Индотрил» имеет хороший профиль безопасности: входящий в его состав тиотриазолин нивелирует гастро-, гепато-, нефро- и хондротоксичность индометацина [5-6].

Целью данной работы было выяснение механизмов синергичного взаимодействия компонентов «Индотрила» - индометацина и тиотриазолина - в реализации фармакологических эффектов.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** В эксперименте использовано 50 белых крыс массой 180-200 г., которые были распределены на группы по 10 особей следующим образом: 1 группа - контроль (животные, подвергшиеся электроболевному раздражению), 2 группа - животные, подвергшиеся электроболевному раздражению на фоне введения таблеток «Индотрил» (доза индометацина 5 мг/кг), 3 группа - животные, подвергшиеся электроболевному раздражению на фоне введения индометацина в дозе 5 мг/кг, 4 группа - животные, подвергшиеся электроболевному раздражению на фоне введения тиотриазолина в дозе 15 мг/кг, 5 группа - интактные животные. Препараты вводились однократно перорально за час до раздражения.

Модель острой боли формировали раздражением корня хвоста крысы через стальные игольчатые электроды с постепенно нарастающей силой тока [7]. Порог болевой чувствительности определяли по появлению голосовой реакции на постепенно нарастающее раздражение стимулятором ЭСЛ-1. Декапитацию осуществляли сразу же после стимуляции. Выделенные образования мозга (кора больших полушарий, ствол, гиппокамп) гомогенизировали и в полученном супернатанте регистрировали накопление продуктов реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК - р.п.), активность фермента антиоксидантной защиты - супероксиддисмутазы (СОД) и концентрацию простагландина E2 (ПГЕ2) [8, 9]. Содержание ПГЕ2 в гомогенатах образований головного мозга крыс определяли с помощью набора Prostaglandin E2 ELISA KIT (RDS) иммуноферментным методом.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время накоплен большой экспериментальный материал, позволяющий считать, что изменения в составе липидов и белков мембран, их структурные характеристики и функциональная активность строго взаимосвязаны и кооперативны. Так, по данным Д.А. Сутковского [10] существует пропорциональная зависимость между тяжестью болевого синдрома и степенью активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) у больных с разными нозологическими формами неврологи-

ческой патологии. Очевидно, продукты ПОЛ могут быть использованы в качестве индикаторов боли и показателей эффективности антиноцицептивных мероприятий, что было доказано и нами в предыдущих исследованиях [11].

Одновременно с этим, интенсивность образования простагландинов (непосредственных участников формирования ноцицептивной реакции), о чем свидетельствуют многочисленные данные литературы [12, 13], меняется в зависимости от присутствия прооксидантов и антиоксидантов.

Значительные изменения в уровне продуктов ферментативного и неферментативного окисления арахидоновой кислоты обнаружены нами в случае моделирования состояния острой боли (рис. 1). Особенно следует отметить сдвиги в концентрации ТБК-р.п. в коре (увеличение на 59,0%) и стволе мозга (увеличение на 93,9%), а также изменения активности СОД (уменьшение на 20,8% в коре и на 15,8% в стволе). Значительные изменения отмечены и в гиппокампе.

Концентрация ПГЕ2 во всех исследованных структурах повышалась, что указывает на общность патологической роли как свободнорадикального окисления так и активации циклооксигеназного механизма с образованием ПГЕ2. Однако эти изменения не имеют прямой корреляционной связи. Так, при значительном усилении образования ТБК-р.п. в стволе мозга, уровень ПГЕ2 изменяется незначительно (всего на 21,3% по сравнению с интактными животными). В тоже время количество продуктов циклооксигеназного окисления арахидоновой кислоты в гиппокампе и коре мозга значительно возрастает. Этот факт не отрицает наличие связи между свободнорадикальным и циклооксигеназным превращением арахидоновой кислоты и, вероятно связан с особенностями гомеостаза и функциональным значением каждого образования мозга.

Исследованные лекарственные средства изменяли статус окислительных процессов в образованиях мозга одновременно с нарушением синтеза ПГЕ2. Наиболее серьезные изменения в концентрации продуктов неферментативного окисления ненасыщенных жирных кислот и активности фермента антиоксидантной защиты препараты вызвали в коре мозга (рис. 2).

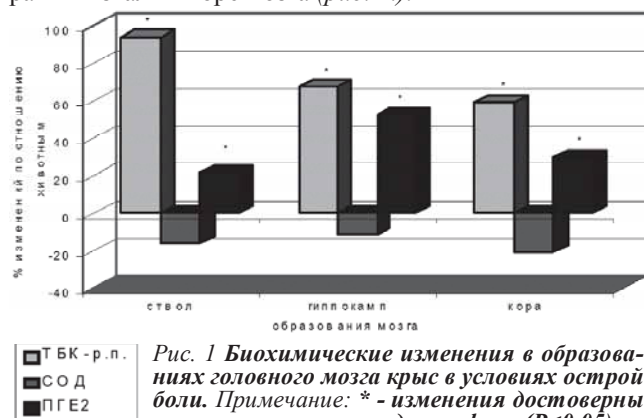


Рис. 1 Биохимические изменения в образованиях головного мозга крыс в условиях острой боли. Примечание: \* - изменения достоверны по отношению к исходному фону ( $P < 0,05$ )

Так, индометацин и тиотриазолин проявили здесь очень близкую антиоксидантную активность, хотя тиотриазолин вызывал большую редукцию ТБК-р.п. (на 34,1% по сравнению с индометацином, который снижал концентрацию на 30,3%). Комбинированный препарат значительно

но активировал СОД (на 78,9%) и уменьшал количество продуктов ПОЛ на 45,5%. Очень интересными оказались наблюдения за изменением концентрации ПГЕ2 в коре больших полушарий: антиоксидант уменьшал его количество, что свидетельствует о существовании взаимосвязи между АФК, свободными радикалами и циклооксигеназной (ЦОГ) активностью. Тем ни менее, индометацин – классический ингибитор ЦОГ – более активно вмешивался в синтез ПГЕ2 и снижал его концентрацию в коре на 66,5%, а при его одновременном использовании с тиотриазолином количество ПГЕ2 уменьшается на 71,5%, что свидетельствует о синергизме компонентов.

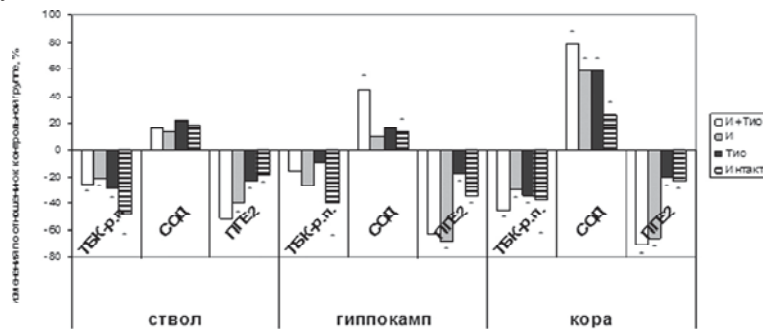


Рис. 2 Биохимические изменения в образованиях мозга крыс при применении исследуемых препаратов в условиях острой боли. Примечание: \* - изменения достоверны по отношению к исходному фону ( $P < 0,05$ )

По-видимому ствол мозга не отличается высокой активностью ЦОГ и ПГЕ2. В то же время здесь все исследованные лекарственные средства показали хорошую антиоксидантную активность. Возможно благодаря наличию антирадикальных свойств тиотриазолин препятствовал чрезмерной активации ЦОГ и синтезу ПГЕ2 свободными радикалами и АФК. Препарат снижал количество ТБК-р.п. на 28,9% и ПГЕ2 – на 23,2%. Комбинированный препарат, содержащий блокатор ЦОГ и антиоксидант, также снижал количество продуктов ПОЛ (на 25,0%) и серьезно уменьшал концентрацию ПГЕ2 (на 51,9%). На наш взгляд, в стволе мозга экспрессия ЦОГ может значительной частью обеспечиваться свободными радикалами, образующимися при активации проводящих ноцицептивные импульсы нервных волокон.

Антиоксидантная активность тиотриазолина в гиппокампе представлена очень слабо: заметно некоторое увеличение активности СОД и сниженное количество продуктов ПОЛ. Тем ни менее количество ПГЕ2 меньше, чем в контрольной группе. Видимо слабая антиоксидантная активность тиотриазолина здесь и не способствует более выраженному проявлению «антипростагландиновой активности» комбинированного средства.

Индометацин и тиотриазолин обладают антиоксидантными свойствами, однако НПВС известен в качестве ингибитора свободных радикалов, а антиоксидант тиотриазолин, помимо связывания со свободными радикалами, является еще и мощным стимулятором синтеза, протекции и активности антиоксидантных ферментов, что в результате свидетельствует о синергизме. Кроме того, сочетание ингибитора пероксинитрит-радикала и ингибитора синтеза ПГЕ2 считается очень удачным в реализации обезболивающего и противовоспалительного эффекта



препарата, так как именно пероксинитрит-радикал выступает потенциальным медиатором боли и воспаления, запускающим синтез ПГ через активацию ЦОГ [14].

Обнаруженные изменения в интенсивности процессов ПОЛ и концентрации ПГЕ2 отразили степень участия структур мозга в развитии ноцицептивной реакции. Наибольшие изменения обнаружены в коре больших полушарий, что не удивительно, так как кора выполняет значительную роль в модуляции болевой чувствительности. С другой стороны, кора, как оказалось, при невысокой активности одного из ключевых ферментов антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы в норме содержит невысокую концентрацию продуктов перекисного окисления. Данные литературы [15] свидетельствуют о том, что кора, как наиболее молодой в филогенетическом отношении отдел, обеспечена ферментами редокс-системы глутатиона лучше, чем ствол. Напротив в стволовой части мозга активность каталазы и супероксиддисмутазы значительно выше, чем в коре мозга. Глутатионпероксидазная реакция является наиболее вероятным механизмом разрушения перекисей в мозге. Таким образом, несмотря на неполноценное представительство ферментов в коре она всё-таки является защищенной, тем более, если учесть, что глутатионпероксидаза в отличие от супероксиддисмутазы, разрушает перекисную группировку без образования свободнорадикальных продуктов и тем самым исключает возможность окислительного повреждения клеточных компонентов при распаде перекиси.

В то же время известно, что индуцибельная изоформа ЦОГ преобладает в мозге (особенно в гиппокампе, где ее активация осуществляется вследствие эксайтотоксичности и образования свободных радикалов) [16]. ЦОГ-2 обнаружена в перинуклеарных, дендритных и аксональных доменах нейронов преимущественно в коре, гиппокампе, миндалине, дорзальных рогах спинного мозга [17, 18].

Синергичное взаимодействие двух процессов – торможение продукции ПГЕ2 и угнетение процессов ПОЛ – в механизме выраженного фармакологического действия изучаемой комбинации – таблеток «Индотрил» на наш взгляд является наиболее приближенным к истине объяснением механизма действия препарата, однако требует более детального исследования в разных условиях. В организме функционируют и другие процессы, регулирующие метаболизм ненасыщенных жирных кислот. Так, например, известно, что АФК оказывают двухфазное активизирующее влияние на продукцию ПГЕ2: в определенных количествах стимулируют синтез, в токсических – угнетают его, т.е. в целом оказывают модулирующее действие [19, 20].

Тем не менее, не отрицая патогенетического значения процессов ферментативного (ЦОГ-зависимого) и неферментативного (свободнорадикального) окисления арахидоновой кислоты головного мозга в ноцицептивном ответе, можно предположить возможность существования синергичных взаимодействий между ними, что подтверждает рациональность комбинирования индометацина с тиапризолином и создания таблеток «Индотрил».

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century// *Subcell Biochem.* – 2007. – Vol.42. – P.3-27

2. Подплетняя Е.А. Анальгетическая активность индомета-

цина в комбинации с тиапризолином при артрозе у крыс. // *Медицина хімія.* – 2008. – №2. – С.75-78

3. Мамчур В.И., Подплетняя О.А., Мазур І.А., Макаренко О.В., Чернов С.О. Экспериментальне обґрунтування можливості підвищення ефективності та безпечності індометацину//Журн. «Клінічна фармація». – 2008. – Том 12. – №2. – С.61-65

4. Подплетняя Е.А., Кучеренко Л.И., Мамчур В.И. Особенности эмоционально-поведенческого статуса животных с моделируемым артрозом при лечении препаратом «Индотрил»// *Запорожский медицинский журнал.* – 2008. – №3. – С.82-87 № 4. – С. 3-17.

5. Подплетняя Е.А. Экспериментальное обоснование возможности снижения нефро- и гепатотоксичности индометацина с помощью тиапризолина. // *Журн. Вісник Вінницького Національного Медичного Університету* 11(2\1)2007 - С. 520-523.

6. Мамчур В.И., Мазур І.А., Волошин М.А., Кучеренко Л.И., Подплетняя Е.А., Проценко Т.В., Противовоспалительный и хондропротекторный эффекты нового комплексного препарата индометацина и тиапризолина. // *Мат. межд. науч.-практ. конф.* – Коломна, 20 апреля 2007. – Коломна, 2007. – С.97-100

7. Декларацийний патент на корисну модель № 7625, МПК 7 А61В5/053, Україна, Спосіб моделювання гострого болю у щурів / Подплетняя О.А., Мамчур М.В., Чабаненко Д.В.; Заяв. 17.02.2004; Опубл. 15.07.2005 Бюл. № 7.

8. Гончаренко М.С., Латинова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов // *Лабораторное дело.* - 1985. - №1. - С. 60-61.

9. Макаренко Е.В. Комплексное определение активности супер-оксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах у больных с хроническими заболеваниями печени // *Лабораторное дело.* - 1988. - № 11. - С. 48-50.

10. Зозуля Ю.А., Барабой В.А., Сутковой Д.А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. – М: Знание-М, 2000. – 344с.

11. Подплетняя Е.А. Влияние ненаркотических анальгетиков на процессы перекисного окисления липидов в образованиях головного мозга крыс в условиях острого болевого раздражения: Дис. ...канд.биол.наук: 14.03.05.; защищена 15.11.2000; Утверждена 11.04.2001. – Дн-ск, 2000. – 140с.

12. Mutoh M., Takahashi M., Fukuda K., et al. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship// *Jpn. J. Cancer Res.* - 2000. -Vol 91. -№7. -P. 686-91

13. Jiang Q., Ames B.N. Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats// *FASEB J.* - 2003. -Vol 17. -№8. -P. 816-22

14. Ndengele MM, Cuzzocrea S, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Matuschak GM, Salvemini D. Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity// *FASEB J.* 2008 May 22.

15. Герасимов А.М., Королева Л.А., Брусков О.С. и др. Ферментативные механизмы торможения перекисного окисления в различных отделах головного мозга крыс // *Вопр. мед. химии.* - 1976. - Т. 22. - № 1. - С. 89-94.

16. Pepicelli O, Fedele E, Berardi M, Raiteri M, Levi G, Greco A, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus// *J Neurochem.* 2005 Jun;93(6):1561-7

17. Aid S., Langenbach R., Bosetti F. Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2// *J Neuroinflammation.* 2008; 5: 17. Published online 2008 May 19. doi: 10.1186/1742-2094-5-17

18. Breder CD, Dewitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain// *J Comp Neurol.* 1995 May 1;355(2):296-315

19. Adler S, Stahl RA, Baker PJ, Chen YP, Pritzl PM, Couser WG. Biphasic effect of oxygen radicals on prostaglandin production by rat mesangial cells// *Am J Physiol.* 1987 Apr;252(4 Pt 2):F743-9

20. Fujimoto Y, Uno E, Sakuma S. Effects of reactive oxygen and nitrogen species on cyclooxygenase-1 and -2 activities// *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004 Nov;71(5):335-40.

**Сведения об авторах:** Подплетняя Е.А. – к.б.н., зав.каф. общей и клинической фармации Днепропетровской государственной медицинской академии (ДГМА), Кучеренко Л.И. – к. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии Запорожского государственного медицинского университета, Мамчур В.И. – д.м.н., зав.каф. фармакологи ДГМА Слесарчук В.Ю. – преподаватель кафедры общей и клинической фармации ДГМА Стефаник М.И. – ст. лаб.каф. фармакологии ДГМА