

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ІМУНОТРОПНОЇ, АНТИНОЦИЦЕПТИВНОЇ ТА АНТИЦИКЛООКСИГЕНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ ІНДОТРИЛУ ТА НАТРІЮ ДИКЛОФЕНАКУ

Ключові слова: нестероїдні протизапальні лікарські засоби, індотрил, натрію диклофенак, тіотриазолін, імунітет, біль, запалення

У статті наведено результати експериментальних досліджень імунотропної, анальгетичної та антициклооксигеназної активності нового лікарського засобу індотрил у порівнянні з класичним представником групи нестероїдних протизапальних лікарських засобів – натрію диклофенаком. Виявлено, що індотрил справляє меншу пригнічувальну дію на гуморальний імунітет, ніж натрію диклофенак. Однак, при цьому чинить більш виражену антиноцицептивну дію та значніше знижує активність простагландинсинтетази.

При багатьох захворюваннях існує необхідність довготривалого приймання нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЗЗ) і перед кожним лікарем постає проблема раціонального вибору препарату та адекватної схеми лікування із застосуванням індивідуального підходу для кожного пацієнта з урахуванням ефективності та безпечності призначеного препарату [1]. Отже тривалість приймання НПЗЗ також може сприяти розвитку побічних ефектів та спричинити розлади у функціонуванні імунної системи.

Розуміння ролі простагландинів (ПГ) та ізоформ циклооксигенази (ЦОГ) у функціонуванні імунної системи сприятиме впровадженню новітніх терапевтичних підходів, спрямованих на оптимізацію можливостей лікування запальних захворювань [2]. Експериментально доведено, що концентрацію ЦОГ-1 можна змінювати у багатьох тканинах, зокрема центральний орган імуногенезу – тимус [3, 4]. ЦОГ-2 навпаки є практично відсутньою у стані спокою, але індукується у макрофагах, фібробластах, ендотелії судин та гладенькою м'язових клітинах під впливом різноманітних цитокінів, ендотоксинів та пухлинних промоутерів [5–8]. ПГ є медіаторами запалення, які впливають як на гуморальний, так і на клітинний імунітет. ЦОГ та ПГ беруть участь у регуляції функцій поліморфно-ядерних лейкоцитів [9, 10], макрофагів, дендритних клітин [11, 12]. Відомо, що ейкозаноїдам належить ключова роль в регуляції клітинного імунітету, вони здатні впливати на Т-клітинну проліферацію та активацію [13, 14]. ПГЕ₂ може непрямим шляхом модулювати гуморальні імунні реакції, зсуваючи баланс імунної відповіді до типу Th₂ у відповідь на продукцію цитокінів, котрі потенціюють В-клітинно-опосередковану гуморальну імунну відповідь [15, 16].

Існує думка, що деякі нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) можуть мати додаткові імуномодулюючі властивості, практично пов'язані із пригніченням синтезу ПГ [17–20]. Відомо, що серед НПЗЗ – натрію диклофенак та індометацин здатні пригнічувати функції імунної системи [21, 22]. Зокрема, вони гальмують міграцію стовбурових клітин, Т- і В-лімфоцитів, перешкоджають передаванню антигенної інформації за рахунок зниження фагоцитарної активності та хемотаксису фагоцитів [17, 23].

Неоднозначність даних експериментальних досліджень стосовно імунотропних ефектів НПЗЗ ускладнюють раціональний вибір протизапального препарату при конкретному захворюванні.

Тому метою нашої роботи було оцінити у порівняльному аспекті вплив на імунну систему «стандарту» протизапальної терапії натрію диклофенаку та нового препарату «Індотрил», розробленого на основі комбінації антиоксиданту тіотриазоліну та відомого протизапального засобу – індометацину. Вивчали вплив досліджуваних засобів на фактори неспецифічного імунітету, а також гуморальну та клітинну імунну відповідь для підвищення ефективності та безпечності фармакотерапії неопіодними анальгетиками.

Матеріали та методи досліджень

Експерименти проведені на білих нелінійних статевозрілих мишах (самцях та самицях),

масою тіла 18–22 г, котрі утримувалися на стандартному раціоні віварію ДДМА. Досліджувані препарати вводили за допомогою зонда внутрішньошлунково (в/ш) протягом 10 діб. Дози порівнюваних препаратів обрані нами згідно з методичними рекомендаціями з доклінічного вивчення імунотоксичної дії лікарських засобів [24]. Так, індоприл (співвідношення індометацину та тіотриазоліну 1:3) вводили дозою 1/10 LD₅₀, а саме 3 мг/кг, натрію диклофенак – у дозі 6 мг/кг (відповідає добовій дозі, яку використовують у клініці). Кожна контрольна група тварин відповідала експериментальній щодо даного лікарського засобу за віком, статтю і масою та отримувала відповідний розчинник (дистильовану воду в кількості 0,1 мл/10 г) шляхом аналогічного введення досліджуваного засобу.

Вивчення впливу досліджуваних засобів на фактори неспецифічного імунітету включало визначення поглинальної здатності нейтрофілів периферичної крові при сумісній інкубації дослідної крові та часток латексу (d – 0,8 мкм) *in vitro*. При цьому визначали фагоцитарний індекс, фагоцитарне число та фагоцитарну активність нейтрофілів [25] та перетравлювальну здатність нейтрофілів периферичної крові мишей (НСТ-тест) [26]. Вплив досліджуваних препаратів на гуморальний імунітет вивчали на мишах, імунізованих еритроцитами барана дозою 2·10⁸, шляхом визначення кількості антитілоутворювальних клітин (АУК) селезінки методом локального гемолізу в гелі агарози [27] та титрів гемаглютининів та гемолізінів у сироватці крові стандартним методом [28]. Вивчення впливу досліджуваних препаратів на клітинну ланку імунної відповіді проводили на імунізованих мишах, відтворюючи реакцію гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) [29].

Для оцінювання антиноцицептивної активності досліджуваних речовин обрано модель «hot plate» термічного подразнення кінцівок мишей [30], досліджувані препарати вводили одноразово. Вивчення впливу досліджуваних лікарських засобів на активність простагландинсинтетази у тромбоцитах та тканинах головного мозку мишей проводили після одноразового внутрішньоочеревинного введення неопіодних анальгетиків на момент розвитку максимального анальгетичного потенціалу. Активність ферменту простагландинсинтетази визначали спектрофотометричним методом [31].

Статистичну обробку даних досліджень проводили з використанням ліцензійної програми STATISTICA (версія 6.1). Математична обробка включала розрахунки середніх арифметичних значень (M), їх похибок (± m). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Ст'юдента (t).

Результати та їх обговорення

Фагоцитоз виступає одним із показників резистентності організму, здійснює його неспецифічний захист від чужорідних агентів за рахунок діяльності фагоцитуючих клітин. Дефіцит неспецифічних факторів імунітету (фагоцитозу) призводить до порушення механізму природної резистентності, що виявляється у вигляді підвищеної частоти інфекцій, які спричинюють умовно-потогенні мікроорганізми, недостатність ефекторних антимікробних реакцій набутого імунітету, підвищення частоти виникнення пухлин.

Аналіз результатів експериментів свідчить, що порівнювані НПЗЗ пригнічували як поглинальну, так і перетравлювальну здатність нейтрофілів крові мишей (табл. 1). Так, натрію диклофенак (6 мг/кг, в/ш) зменшував фагоцитарний індекс нейтрофілів крові тварин на 21,4 % (p < 0,05), при цьому фагоцитарне число знижувалось на 39,1 % (p < 0,05), а фагоцитарна активність пригнічувалась на 38,1 % (p < 0,05) відповідно. Індотрил також (3 мг/кг, в/ш) викликав зниження фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа на 29,3% (p < 0,05) та 33,3% (p < 0,05), а фагоцитарної активності – на 41,2 % (p < 0,05) відносно показників контрольної групи тварин.

Т а б л и ц я 1

Вплив досліджуваних засобів на поглинальну та перетравлювальну здатність нейтрофілів крові у білих нелінійних мишей (M±m, n=8)

Препарат	Доза, мг/кг	Фагоцитарний індекс, %	Фагоцитарне число, у.о.	Фагоцитарна активність, у.о.	НСТ-тест
Натрію диклофенак	К	45,8±3,1	4,6±0,3	2,1±0,3	2,3±0,2
	6	36,0±3,6*	2,8±0,3*	1,3±0,2*	1,6±0,1*
Індотрил	К	39,3±2,1	4,2±0,2	1,7±0,1	2,8±0,3
	3	27,8±2,4*	2,8±0,3*	1,0±0,1*	1,7±0,1*

П р и м і т к и:

* – відхилення показника вірогідно відносно контролю, p < 0,05;

n – кількість тварин; К – контрольні тварини.

Перетравлювальна здатність нейтрофілів крові під впливом натрію диклофенаку (6 мг/кг, в/ш) знижувалась на 30,4 % ($p < 0,05$), а при застосуванні індотрилу (3 мг/кг, в/ш) – на 39,3 % ($p < 0,05$) відносно контролю.

Специфічні механізми імунного захисту філогенетично є значно молодшими, ніж неспецифічні. Їх повний розвиток в імунній відповіді вимагає певного часу, вони є високоселективними, вибірковими і реагують з високою точністю до визначеного агресора. До них належать антитіла, синтезовані В-лімфоцитами та Т-лімфоцити з рецепторами, які зв'язують відповідний антиген. При повторному контакті з даним антигеном бурхливо розвивається специфічна вторинна відповідь, оскільки організм «запам'ятав» перший контакт з даним антигеном. Розрізняють два основні типи імунної відповіді: відповідь гуморального типу і відповідь клітинного типу.

Вплив натрію диклофенаку (6 мг/кг, в/ш) на гуморальний імунітет викликало зниження кількості антитіл, утворюючи клітини (АУК) селезінки, у порівнянні з контролем на 66,3 % ($p < 0,05$), а застосування індотрилу – на 48,1 % ($p < 0,05$) відповідно (табл. 2).

Т а б л и ц я 2

Показники стану гуморальної імунної відповіді у білих нелінійних мишей під впливом досліджуваних засобів ($M \pm m, n=8$)

Препарат	Доза, мг/кг	Кількість лімфоїдних клітин у селезінці, 10^6	Концентрація АУК у селезінці, 10^6	Кількість АУК у селезінці, 10^3	Титр гемолізину, \log_2	Титр гемаглютинінів, \log_2
Натрію диклофенак	К	186,5 \pm 5,4	288,4 \pm 10,3	116,0 \pm 2,9	9,5 \pm 0,7	8,2 \pm 0,2
	6	130,9 \pm 5,4*	408,4 \pm 23,5*	39,1 \pm 1,9*	2,7 \pm 0,4*	2,3 \pm 0,4*
Індотрил	К	181,9 \pm 9,1	278,9 \pm 13,1	134,8 \pm 6,7	9,0 \pm 0,4	8,5 \pm 0,5
	3	126,4 \pm 5,6*	400,4 \pm 17,9*	70,0 \pm 5,9*	7,0 \pm 0,3*	6,8 \pm 0,3*

П р и м і т к и:

* – відхилення показника вірогідно відносно контролю, $p < 0,05$;

n – кількість тварин; К – контрольні тварини.

Порівняльним аналізом впливу досліджуваних препаратів на титри антиеритроцитарних антитіл встановлено, що натрію диклофенак (6 мг/кг, в/ш) чинив інгібуючий вплив на 71,6 % ($p < 0,05$) на титр гемолізину та на 71,9 % ($p < 0,05$) на титр гемаглютинінів. Індотрил (3 мг/кг по індометацину, в/ш) зумовлював зменшення титру гемаглютинінів лише на 20 % ($p < 0,05$) та титру гемолізину на 22,2 % ($p < 0,05$) відповідно.

Реакції гіперчутливості сповільненого типу є захисною формою реагування організму, що забезпечує клітинний протиінфекційний імунітет. За ступенем регуляції реакцій ГСТ в експериментах на мишах можна судити про здатність досліджуваних препаратів впливати на рецептори на Т-ефекторах [32] (табл. 3).

Т а б л и ц я 3

Вплив досліджуваних засобів на реакцію гіперчутливості сповільненого типу у білих нелінійних мишей ($M \pm m, n=8$)

Препарат	Доза, мг/кг	Різниця у масі лап, мг	Індекс реакції, %
Контроль	0,1 мл/ 10 г	15,6 \pm 0,9	11,8 \pm 0,7
Натрію диклофенак	6	8,9 \pm 0,6*	6,7 \pm 0,5*
Індотрил	3	7,5 \pm 0,5*	5,1 \pm 0,3*

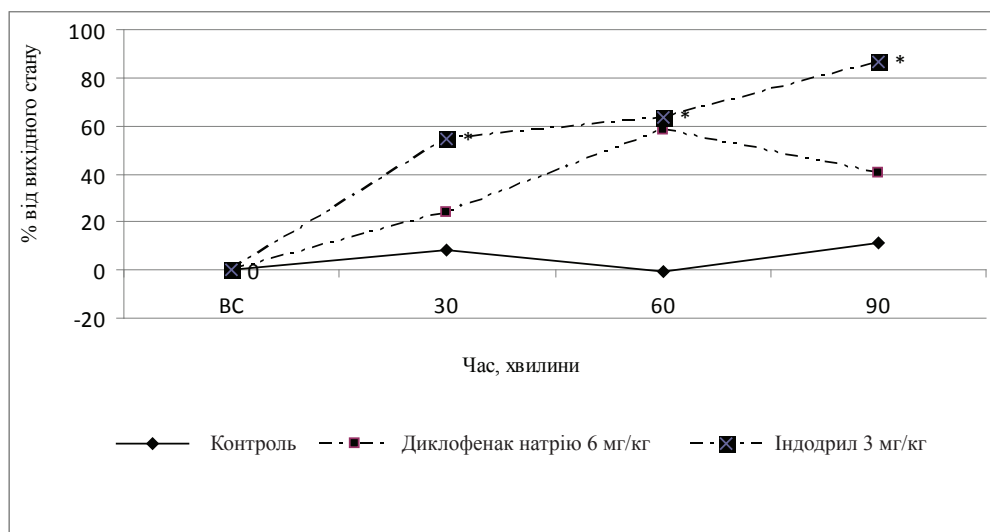
П р и м і т к и:

* – відхилення показника вірогідно відносно до контролю, $p < 0,05$;

n – кількість тварин.

Згідно з даними, отриманими в дослідженнях, встановлено, що натрію диклофенак (6 мг/кг, в/ш) та індотрил знижували індекс реакції ГСТ на 43,4% ($p < 0,05$) та на 56,8% ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з контролем.

Визначення анальгетичної активності на моделі «гарячої пластини» у мишей показало, що досліджувані препарати в дозах, використаних для проведення імунологічних досліджень, мають достатній антиноцицептивний потенціал (рисунок). Зокрема, встановлено таке: натрію диклофенак (6 мг/кг) максимальну антиноцицептивну активність виявив на 60-й хвилині експерименту (58,7 %; $p < 0,05$). У подальшому анальгетичний ефект починав послаблюватися і на 90-й хвилині становив 49,3 % ($p < 0,05$) відповідно.



Анальгетична активність досліджуваних засобів на моделі «hot plate» ($M \pm m$, $n=8$).

П р и м і т к и: * – $p < 0,05$ відносно вихідного стану; n – кількість тварин

Анальгетична активність індотрилу (3 мг/кг) через 30 хв після початку експерименту становила 54,4 % ($p < 0,05$), через годину експерименту підвищилась до 63,3 % ($p < 0,05$). Максимальний антиноцицептивний ефект препарат виявив на 90-й хвилині експерименту, який становив 86,4 % ($p < 0,05$) відповідно.

Протизапальний та анальгетичний ефекти НПЗЗ основним чином зумовлені пригніченням активності ферменту ЦОГ-2, яка відповідальна за продукцію прозапальних простагландинів, однак при нормальному стані організму виявляється у тканинах головного мозку [33, 34]. Згідно з результатами проведених експериментів встановлено, що досліджувані засоби змінюють активність простагландинсинтетази у тканині головного мозку мишей (табл. 4).

Т а б л и ц я 4

Зміни циклооксигеназної активності у білих нелінійних мишей за умов введення досліджуваних знеболювальних засобів ($M \pm m$, $n=8$)

Досліджувані засоби	Дози, мг/кг	Активність ЦОГ, мкмоль/кг	
		тромбоцитарна маса	головний мозок
Контроль	0,1мл/10 г	31,61±2,4	36,56±4,6
Натрію диклофенак	6	17,61*±2,2	9,41*±1,1
Індотрил	3	13,58*±1,1	7,38*±1,5

П р и м і т к а:

* – $p < 0,05$ у порівнянні з показниками групи контролю; n – кількість тварин.

Відмічено вірогідне зниження активності ЦОГ у тканинах головного мозку на фоні введення натрію диклофенаку в дозі 6 мг/кг у 3,9 разу та індотрилу – у дозі 3 мг/кг у 4,9 разу.

Дослідження імуотропної активності нового лікарського засобу «Індотрил» виявило його перевагу перед натрію диклофенаком за впливом на гуморальну ланку імунної відповіді. Також треба відмітити, що у дозі, обраній для проведення імунологічних досліджень, індотрил має виражену антиноцицептивну та антициклооксигеназну активність і переважає за даними показниками натрію диклофенаку. На даний момент не викликає сумнівів і факт активації про-

цесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) при різноманітних патологічних процесах. Антиоксидант тіотриазолін, що входить до складу препарату «Індотрил», має імуномодельовальну дію [35, 36], наряду з антиноцицептивною та протизапальною активністю [37, 38].

Таким чином, комбіноване застосування потужного НПЗЗ – індометацину та антиоксиданту тіотриазоліну дає змогу підвищити фармакологічну ефективність та знизити токсичність протизапальної терапії.

В и с н о в к и

1. Ступінь вираженості інгібуючого впливу на фактори неспецифічного імунітету при тривалому застосуванні індотрилу не переважає «стандарт» протизапальної терапії натрію диклофенаку.

2. Індотрил має менший пригнічувальний вплив на гуморальну ланку імунної відповіді при курсовому введенні, ніж натрію диклофенак.

3. Визначення антиноцицептивної та антициклооксигеназної активності досліджуваних засобів у дозах, обраних для проведення імунологічних досліджень, свідчить, що індотрил переважає натрію диклофенак та має високу антиноцицептивну та антициклооксигеназну активність.

1. *Викторов А.П.* // Провизор. – 2009. – № 8. – С. 10–13.
2. *Nakajima S., Honda T., Sakata D. [et al.]* // J. Immunol. – 2010. – № 184(10). – P. 5595–5603.
3. *Rocca B., Garret A., FitzGerald G.A.* // International Immunopharmacology. – 2002. – № 2. – P. 603–630.
4. *Smith W.L., Langenbach R.* // J. Clin. Invest. – 2001. – № 107. – P. 1491–1495.
5. *Гилман А.Г.* Клиническая фармакология по Гудману и Гилману. Книга вторая. – М. : Практика, 2006. – 336 с.
6. *Макаренко О., Мамчур В.* // Вісник фармакології та фармації. – 2007. – № 8. – С. 48–54.
7. *Chuang P.C., Lin Y.J., Wu M.H. [et al.]* // Am. J. Pathol. – 2010. – № 176 (2). – P. 850–860.
8. *Yuan X.L., Chen L., Li M.X. [et al.]* // Clin. Immunol. – 2010. – № 134 (3). – P. 277–288.
9. *Goldstein I.M., Malmsten C.L., Kindhal H. [et al.]* // J. Exp. Med. – 1978. – № 148. – P. 787–791.
10. *Zurier R.B., Sayadoff D.M.* – Inflammation. – 1975. – № 1. – P. 93–97.
11. *Kalinski P., Schuitemaker J.H., Hilkens C.M., Kapsenberg M.L.* // J. Immunol. – 1998. – № 161. – P. 2804–2809.
12. *Whittaker D.S., Bahjat K.S., Moldawer L.L., ClareSalzler M.J.* // J. Immunol. – 2000. – № 165. – P. 4298–4304.
13. *Uehara A., Yang S., Fujimoto Y. et al.* // Cellular Microbiology. – 2005. – № 7 (1). – P. 53–61.
14. *Bella S.D., Molteni M., Compasso S. et al.* // Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids. – 1997. – № 56. – P. 177.
15. *Harris S.G., Padilla J., Koumas L. et al.* // Trends Immunol. – 2002. – № 23. – P. 144.
16. *Lindner S.C., Köhl U., Maier T.J. et al.* // Journal of Leukocyte Biology. – 2009. – № 86 (2). – P. 389–399.
17. *Трецинский А.И., Усенко Л.В., Зупанец И.А.* – К.: Морион. – 2000. – 63 с.
18. *Kozak W., Wrotek S., Kozak A.* // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2006. – № 290. – P. 871–880.
19. *Weiss A., Littman D.R.* // Cell. – 1994. – № 76. – P. 263.
20. *Jiang C., Ting T., Seed B.* // Mature. – 1998. – № 391. – P. 82.
21. *Кресюн В.И., Бажора Ю.И., Рыбалова С.С.* // Одесса. – 1993. – 208 с.
22. *Goldmann O., Hertzén E., Hecht A. et al.* // J. Immunol. – 2010. – № 185 (4). – P. 2372–2381.
23. *Kim E.J., Park H., Kim J., Park J.H.* // Mol. Carcinog. – 2010. – № 49 (7). – P. 672–683.
24. Доклінічне вивчення імунотоксичної дії лікарських засобів: Метод. рекомендації / Уклад.: Г.М.Бутенко, О.П.Терешіна, Ю.М.Максимов. – К. – 2000. – 19 с.
25. *Лабинская А.С.* Микробиология с техникой исследований. – М. : Медицина, 1982. – 475 с.
26. *Бажора Ю.И., Тимошевский В.Н., Протченко П.З., Головченко А.Н.* // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 198–200.

27. Jerne N.K., Nordin A.A. // Science. – 1963. – № 140. – P. 405–407.

28. McGregor D.D., Gowas J.L. // J. Exp. Med. – 1963. – Vol. 118. – № 2. – P. 303–320.

29. Фримель Г. Иммунологические методы. – М. – 1987. – 472 с.

30. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ, предлагаемых в качестве нестероидных противовоспалительных средств. – К. : ФК МЗ Украины, 1994. – 40 с.

31. Кузнецова Ю.А., Ромах В.Б., Строкін М.Л., Мевх А.Т. // Вестник Моск. ун-та. Химия. – 1998. – Т. 39, № 5. – С. 302–304.

32. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. – М.: Мир, 2000. – 592 с.

33. David M., Kuhn T.M., Kuhn D.M. // JPET – 2005. – Vol. 313. – P. 870–876.

34. Crofford L.J., Lipsky P.E., Brooks P. et al. // Arthr. and Rheum. – 2000. – Vol. 43. – P. 4–14.

35. Мазур И.А., Волошин Н.А., Чекман И.С. и др. Тиотриазолин. – Запорожье, Львов, 2005. – 156 с.

36. Мерзляк С.В. // Зб. наук. праць. Запоріжжя, 1999. – Вип. – № 3. – С. 266–270.

37. Подплетняя Е.А. // Медична хімія. – 2008. – Т.10. – № 2. – С. 75–78.

38. Подплетняя Е.А., Мазур И.А., Мамчур В.И. // Запорожский медицинский журнал. – 2008. – № 2. – С. 129–134.

Надійшла до редакції 30.06.2011.

Е.А.Подплетняя, О.Н.Поэта, В.И.Мамчур

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОТРОПНОЙ, АНТИНОЦИЦЕПТИВНОЙ И АНТИЦИКЛООКСИГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ИНДОТРИЛА И НАТРИЯ ДИКЛОФЕНАКА

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные средства, индотрил, натрия диклофенак, тиотриазолин, иммунитет, боль, воспаление

В статье представлены результаты экспериментальных исследований иммунотропной, анальгетической и антициклооксигеназной активности нового лекарственного средства «Индотрил» в сравнении с классическим представителем группы нестероидных противовоспалительных средств – натрия диклофенаком. Обнаружено, что индотрил в меньшей степени, чем натрия диклофенак угнетает гуморальный иммунитет, однако при этом обладает более выраженным антиноцицептивным действием и значительно снижает активность простагландинсинтетазы.

О.А.Подплетняя, О.Н.Поэта, В.И.Мамчур

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE IMMUNOTROPIC, ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-CYCLOOXYGENASE ACTIVITY OF INDOTRIL AND DIKLOFENAC SODIUM

Keywords: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, Indotril, Diklofenac sodium, Thiotriazolin, immunity, pain, inflammation

S U M M A R Y

In the article are the results of the experimental of the investigations of the immunotropic, analgesic and anti-cyclooxygenase activity of the new medicine of Indotril in the comparison with the classical representative of the group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs - Diklofenac sodium. It is discovered, that Indotril to a lesser degree how Diklofenac sodium suppresses humoral immunity; however, in this case, possesses the more expressed antinociceptive action and more significantly is decreased the activity of prostaglandin synthetase.