

УДК [616.276+615.212]: 547.567.5

ВЛИЯНИЕ 1,4-БЕНЗОХИНОНА И ТИМОХИНОНА НА КАРРАГЕНИНОВОЕ ВОСПАЛЕНИЕ У МЫШЕЙ

Рашкевич О. С., Волчек А. В.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. В работе изучены противовоспалительные свойства 1,4-бензохинона и тимохинона при однократном внутрибрюшинном введении на модели каррагенинового отека лапы у мышей. Показано, что исследованные производные хинона обладают значительным зависимым от дозы противовоспалительным эффектом. При этом рассчитанная методом регрессионного анализа среднеэффективная доза 1,4-бензохинона на данной модели составила 4,47 мг/кг, а среднеэффективная доза тимохинона — 57 мг/кг. Так, 1,4-бензохинон и тимохинон могут представлять интерес для дальнейших исследований в качестве индивидуальных противовоспалительных средств, а также возможных компонентов в составе противовоспалительных комбинаций.

Ключевые слова: 1,4-бензохинон, тимохинон, диклофенак, НПВС, воспаление, мышцы, каррагенин.

Введение. Воспаление — это универсальная сосудисто-мезенхимальная реакция организма на повреждение, в которой участвуют факторы гуморального и клеточного иммунитета, система гемостаза и процессы репарации. Это явление характерно для большинства заболеваний, с биологической точки зрения оно выполняет защитно-приспособительную функцию и в конечном итоге направлено на восстановление гомеостаза. В клинической практике воспаление рассматривают как патологический процесс, приводящий к деструкции и нарушению функции тканей. В связи с этим фармакологические модуляторы воспаления имеют большое значение и широко используются в медицине. Для уменьшения отека тканей, боли и других симптомов при воспалении применяют главным образом две группы лекарств: нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) и глюкокортикостероиды (ГКС).

ГКС ингибируют как клеточный, так и гуморальный компонент воспалительной реакции, снижают продукцию вазоактивных и хемоаттрактивных факторов, уменьшают секрецию липолитических и протеолитических ферментов, подавляют экстравазацию лейкоцитов в области повреждения, тормозят экспрессию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО- α), а также циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) и NOS2. Плейотропность противовоспалительного действия ГКС обуславливает чрезвычайно высокую эффективность этих средств, однако такие побочные эффекты, как надпочечниковая недостаточность, водно-электролитные нарушения, гипертензия, ги-

пергликемия, повышенная восприимчивость к инфекциям, пептические язвы, остеопороз, миопатии, поведенческие расстройства, катаракта, задержка роста и характерный габитус передозировки стероидов препятствуют их широкому применению.

НПВС представляют собой одну из наиболее востребованных групп лекарственных средств для лечения воспаления и боли. Они нашли широкое применение благодаря их безопасности, доступности и удовлетворительной эффективности. Противовоспалительное, болеутоляющее и жаропонижающее действие этих препаратов связано со снижением ЦОГ2-зависимого синтеза простагландинов (ПГ). Однако противовоспалительный эффект НПВС ограничен определенным пределом, выше которого он не может возрасти при простом увеличении дозы. На экспериментальных моделях воспаления кривая доза—эффект ингибиторов ЦОГ выходит на плато при ингибировании (в зависимости от применяемого индуктора или ирританта) от 20 до 70 % воспалительного отека [1], что обусловлено различным, но ограниченным вкладом ПГ в патологический процесс. Очевидно, что эффективность НПВС нельзя повысить путем совместного применения нескольких ингибиторов ЦОГ. Поэтому определенный интерес представляет поиск средств, влияющих на другие медиаторы острой фазы воспаления и использование таких соединений, как для монотерапии, так и в комбинации с НПВС.

Одно из перспективных направлений поиска потенциальных противовоспалительных

средств — производные хинона, которые известны антиоксидантными свойствами и влиянием на процессы генерации энергии в клетке. В настоящей работе представлены результаты изучения противовоспалительных свойств двух субстанций, выбранных в ходе предварительного скринингового исследования — тимохинона и 1,4-бензохинона, на модели острого каррагенинового воспаления у мышей.

Цель работы — изучение противовоспалительной активности и эффективности тимохинона и 1,4-бензохинона на модели острого каррагенинового воспаления у мышей.

Материалы и методы. Исследование проведено в условиях экспериментальной лаборатории НИЧ БГМУ в соответствии с нормами биомедицинской этики и правилами гуманного обращения с животными, с соблюдением требований Европейской конвенции 86/609 ЕЕС. Противовоспалительную активность субстанций исследовали в опытах на 50 нелинейных мышцах-самцах массой 26–32 г на модели острого каррагенинового отека лапы, воспроизводящего экссудативно-клеточную фазу воспаления. Лямбда-каррагенин — ионогенный полисахарид, модельный флогогенный агент, широко используемый в экспериментальной медицине для скрининга и изучения противовоспалительных средств. Субплантарное введение каррагенина вызывает у мышей выраженную воспалительную реакцию, характеризующуюся 3-фазной динамикой течения. Первая фаза (нарастания отека) — занимает около 2 ч после инъекции флогогена, вторая фаза (плато) продолжается примерно два последующих часа и третья фаза (регрессии отека) занимает последующие от 4 до 12 ч, завершаясь обычно восстановлением исходных параметров конечности. Молекулярный механизм воспаления после введения в ткани геля каррагенина включает: индукцию ИЛ-8; посредством толл-подобных рецепторов типов 4 и 6 и активных форм кислорода активацию NF- κ B; наработку ПГ E2. Цитокины ИЛ-6 и ФНО- α не принимают участия в инициации каррагенинового воспаления [2]. Ирритант лямбда-каррагенин приобретен в Sigma Aldrich (США). Субстанции тимохинона и 1,4-бензохинона были предоставлены кафедрой радиационной медицины и химико-фармацевтических технологий химического факультета Белорусского государственного университета; использован диклофенак производства «Берлин-Хеми АГ» (Германия).

Подопытные и контрольные группы по 6 мышей формировали методом рандомизации по массе тела в качестве ведущего признака. За

40 мин до индукции воспаления животным внутрибрюшинно в объеме 0,4 мл/10 г массы тела вводили препараты: 1,4-бензохинон в дозах 1 мг/кг, 2 мг/кг и 5 мг/кг; тимохинон в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг, составляющих менее 1/10 LD₅₀. В качестве препарата сравнения применяли диклофенак в дозе 10 мг/кг, обладающий стандартной для НПВС противовоспалительной эффективностью и использующийся в качестве эталона в подобных исследованиях. Для растворения субстанций использовали изотонический водный раствор хлорида натрия с добавлением 1%-го этанола и 1%-го диметилсульфоксида. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя.

Острое воспаление вызывали путем введения 1%-го водного раствора лямбда-каррагенина по 0,03 мл под плантарный апоневроз задней правой лапы. Воспалительную реакцию оценивали по величине отека стопы через 1, 2, 3, 4, 5 и 24 ч после инъекции флогогена. Толщину стопы измеряли с помощью микрометрического устройства с точностью до 0,01 мм в условиях постоянного давления. Величину отека выражали в миллиметрах. Противовоспалительный эффект соединений определяли по индексам ингибирования (*I*) различных фаз воспалительной реакции в сравнении с плацебо и рассчитывали по формуле

$$I = \frac{100 \cdot (Sd - Sp)}{Sp},$$

где *Sd* и *Sp* — средние значения площадей под кинетическими кривыми отека лапы соответственно для групп, получавших испытуемые препараты или плацебо.

Значения *Sd* и *Sp* находили методом суммирования площадей трапеций под кривыми в координатах время—эффект. Полученные данные обрабатывали с использованием параметрических и непараметрических критериев вариационной статистики. Различия между группами признавали достоверными при $p < 0,05$. Эффективные дозы (ED16–ED84) субстанций определяли методом регрессионного анализа с использованием вычислительных возможностей компьютерной программы Microsoft Excel. Уравнение регрессии считали качественным при ошибке аппроксимации данных менее 15 %.

Результаты и их обсуждение. Действие диклофенака, тимохинона и 1,4-бензохинона на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей представлено в таблицах 1–3.

Таблица 1 — Влияние диклофенака, тимохинона и 1,4-бензохинона на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей ($M \pm m$)

Субстанция	Доза мг/кг	Прирост толщины стопы (мм)					
		1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	24 ч
Плацебо	—	0,82 ± 0,06	0,94 ± 0,07	0,99 ± 0,04	0,74 ± 0,06	0,61 ± 0,07	0,56 ± 0,06
Диклофенак	10	0,62 ± 0,05	0,70 ± 0,11	0,65 ± 0,06*	0,54 ± 0,08	0,43 ± 0,05	0,32 ± 0,04
Тимохинон	5	0,74 ± 0,06	0,77 ± 0,07	0,78 ± 0,05	0,54 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,44 ± 0,04
	10	0,72 ± 0,08	0,62 ± 0,10*	0,82 ± 0,12	0,71 ± 0,11	0,50 ± 0,09	0,37 ± 0,06
	20	0,70 ± 0,05	0,68 ± 0,06	0,76 ± 0,08*	0,57 ± 0,09	0,47 ± 0,07	0,36 ± 0,05
1,4-бензохинон	1	0,75 ± 0,06	1,19 ± 0,07	0,93 ± 0,04	0,81 ± 0,05	0,64 ± 0,05	0,55 ± 0,04
	2	0,70 ± 0,06	0,97 ± 0,12	0,87 ± 0,64	0,77 ± 0,04	0,61 ± 0,02	0,53 ± 0,03
	5	0,55 ± 0,07	0,64 ± 0,07*	0,63 ± 0,07*	0,61 ± 0,08	0,52 ± 0,08	0,38 ± 0,02

* $p < 0,05$ в сравнении с плацебо по критерию Дункана; $n = 6$.

Таблица 2 — Площади под кривой (AUC) различных фаз каррагенинового воспаления лапы (mm^2) у мышей диклофенака, тимохинона и 1,4-бензохинона ($M \pm m$)

Субстанция	Доза, мг/кг	Фазы воспалительного отека			
		0–2 ч	2–5 ч	0–5 ч	0–24 ч
Плацебо	—	1,29 ± 0,08	2,51 ± 0,10	3,80 ± 0,16	4,39 ± 0,22
Диклофенак	10	0,96 ± 0,10*	1,75 ± 0,20*	2,71 ± 0,30*	3,08 ± 0,32*
Тимохинон	5	1,13 ± 0,09	1,95 ± 0,10	3,08 ± 0,19	3,55 ± 0,18
	10	1,03 ± 0,13	2,09 ± 0,30	3,11 ± 0,43	3,54 ± 0,48
	20	1,04 ± 0,08	1,90 ± 0,22*	2,94 ± 0,29*	3,35 ± 0,34*
1,4-бензохинон	1	1,34 ± 0,08	2,65 ± 0,09	3,40 ± 0,12	4,58 ± 0,13
	2	1,18 ± 0,10	2,43 ± 0,15	3,61 ± 0,22	4,18 ± 0,22
	5	0,84 ± 0,10*	1,81 ± 0,22*	2,67 ± 0,31*	3,13 ± 0,35*

* $p < 0,05$ в сравнении с плацебо по критерию Дункана; $n = 6$.

Таблица 3 — Индексы ингибирования различных фаз каррагенинового воспаления лапы (%) у мышей диклофенака, тимохинона и 1,4-бензохинона ($M \pm m$)

Субстанция	Доза, мг/кг	Фазы воспалительного отека			
		0–2 ч	2–5 ч	0–5 ч	0–24 ч
Диклофенак	10	-25,3 ± 8,0*	-30,4 ± 7,9*	-28,7 ± 7,8*	-29,7 ± 7,2*
Тимохинон	5	-12,7 ± 7,2	-22,1 ± 4,1	-18,9 ± 4,9	-19,0 ± 4,0
	10	-20,5 ± 10,2	-16,8 ± 12,1	-18,1 ± 11,4	-19,2 ± 11,0*
	20	-19,5 ± 5,9	-24,3 ± 8,6*	-22,7 ± 7,6*	-23,7 ± 7,8*
1,4-бензохинон	1	+3,9 ± 6,5	+5,6 ± 3,7	+5,0 ± 3,2	+4,4 ± 3,0
	2	-8,5 ± 7,5	-3,1 ± 5,8	-4,9 ± 5,9	-4,7 ± 4,9
	5	-32,2 ± 7,8*	-27,7 ± 8,6*	-29,2 ± 8,2*	-28,5 ± 8,0*

* — $p < 0,05$ в сравнении с плацебо по критерию Дункана; $n = 6$.

Каррагенин при введении под плантарный апоневроз у мышей вызывал выраженный воспалительный отек, увеличивая толщину лапы в среднем на $0,99 \pm 0,04$ мм. Острая фаза воспаления продолжалась около 5 ч, максимальные показатели отека лапы регистрировали на 2–3 ч после инъекции каррагенина. Полученные данные свидетельствуют о высокой активности модельного флогогена.

Диклофенак, классическое НПВС, в дозе 10 мг/кг статистически значимо ($p = 0,014$ по критерию Дункана) подавлял все фазы отека лапы у мышей, индекс ингибирования острой фазы воспаления составил $-28,7 \pm 7,8$ (таблицы 1–3), эффект препарата сохранялся на одном уровне на протяжении всего эксперимента. Учитывая, что реакция на каррагенин стабильно воспроизводится и характеризуется

относительно невысокой индивидуальной вариабельностью ответа (коэффициент вариации SD % составляет <20 %), а также эффект эталонного средства диклофенака, примененная модель каррагенинового воспаления у мышей является репрезентативной для оценки противовоспалительной активности и эффективности лекарственных средств.

В дозах 1 и 2 мг/кг 1,4-бензохинон, испытанный на каррагениновой модели воспаления, не оказывал существенного влияния на величину экссудативного отека лапы у мышей. В дозе 5 мг/кг препарат обладал значительным противовоспалительным действием, приближаясь к эффекту препарата сравнения диклофенака в дозе 10 мг/кг (см. таблицы 1–3, рисунок 1).

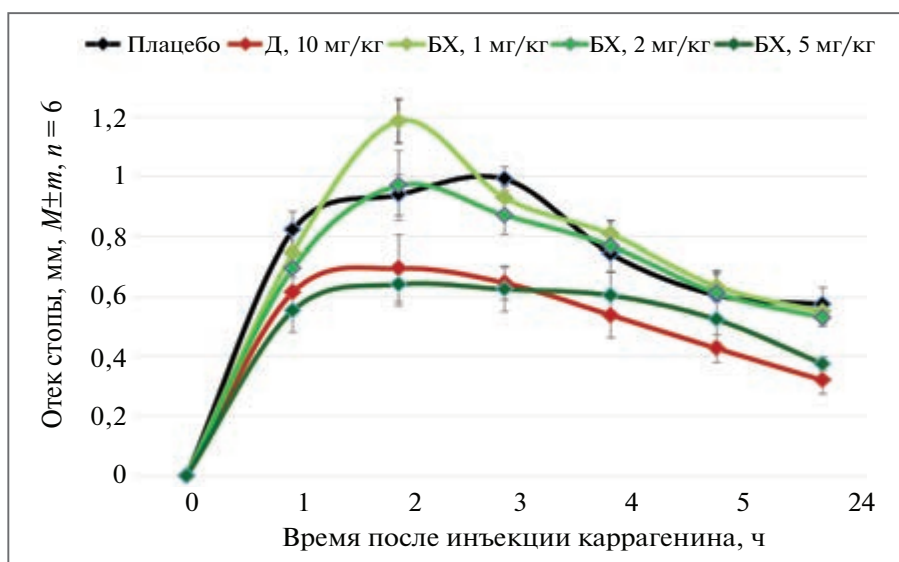


Рисунок 1 — Влияние диклофенака (Д) и 1,4-бензохинона (БХ) на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей (по данным таблицы 1)

По выраженности действия на каждую фазу воспалительного отека в отдельности, продолжительности действия и по интегральному индексу ингибирования 1,4-бензохинон в дозе 5 мг/кг полностью соответствовал препарату сравнения. Регрессионный анализ показал стойкую зависимость доза–противовоспалительный эффект в изученном диапазоне доз, данная закономерность сохранялась на

протяжении всего периода наблюдений. При высоком уровне качества аппроксимации данных (точность более 95 %), рассчитанная среднеэффективная доза 1,4-бензохинона (ED_{50}) на данной модели — 4,47 мг/кг; ED_{16} и ED_{84} составили, соответственно, 2,7 мг/кг и 7,5 мг/кг. Кривые доза–эффект 1,4-бензохинона в лог-нормальных координатах представлены на рисунке 2.

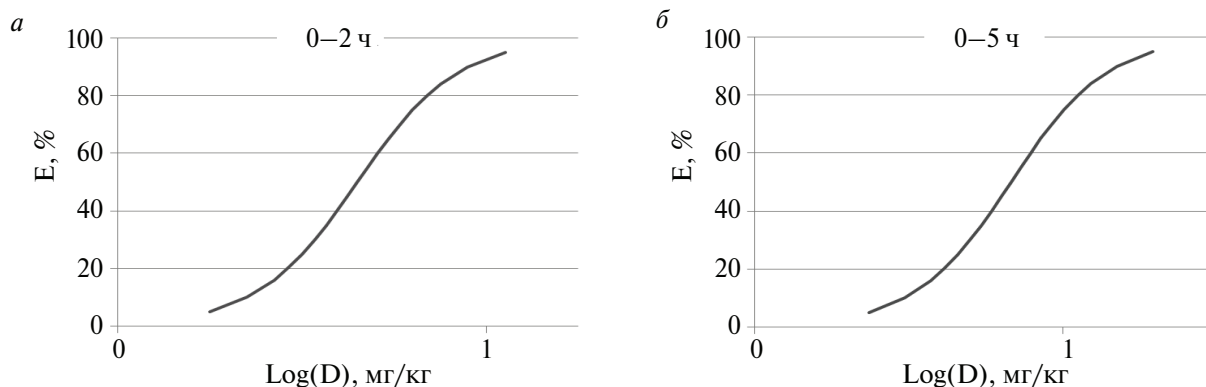


Рисунок 2 — Кривые регрессии доза–противовоспалительный эффект 1,4-бензохинона в лог-нормальных координатах на модели острого каррагенинового воспаления лапы у мышей в начальную и острую фазы отека

Постоянный на протяжении всего эксперимента наклон кривой доза–эффект свидетельствует об едином механизме противовоспалительного действия препарата на все фазы каррагенинового отека.

Тимохинон в дозах 5, 10 и 20 мг/кг в различные фазы острой воспалительной реакции угнетал отечную реакцию на флогоген на 18–

24 %, а его расчетная ED₅₀ по противовоспалительному эффекту составила 56,9 мг/кг. Действие препарата заметно ослабилось на третий час после введения. Регрессионный анализ показал дозозависимый характер изменения величины воспалительного отека у мышей, получавших тимохинон (рисунки 3–4).

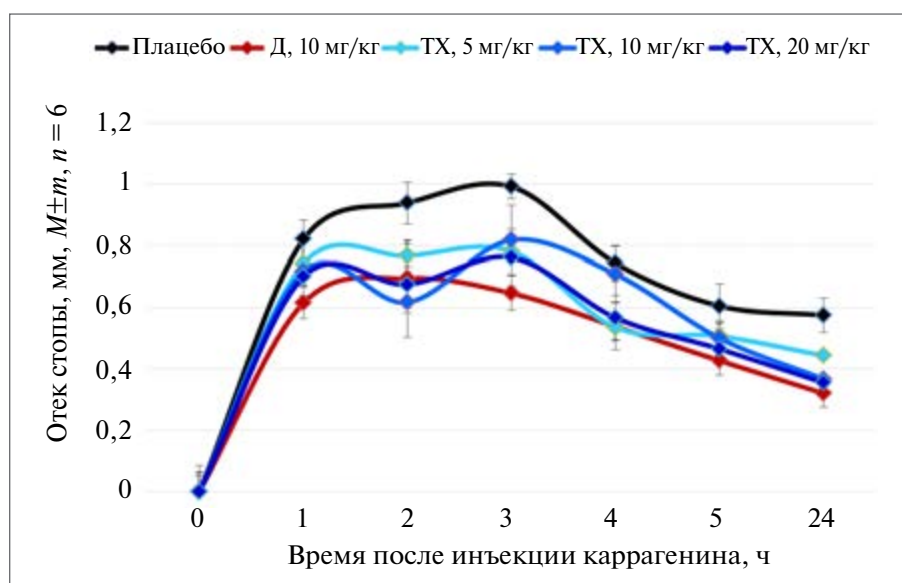


Рисунок 3 — Влияние диклофенака (Д) и тимохинона (ТХ) на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей (по данным таблицы 1)

Большой интерес представляют возможные механизмы противовоспалительного действия 1,4-бензохинона и тимохинона. По литературным данным, тимохинон подавляет окислительный стресс *in vitro* и *in vivo* на различных экспериментальных моделях атеросклероза, метаболического синдрома, воспаления, цитотоксичности [3, 4]. Тимохинон ингибирует NF- κ B и p53-зависимые процессы, а также повышает экспрессию супероксид дисмутазы 1, каталазы, глутатион пероксидазы 2 [5]. Противовоспалительное действие тимохинона может реализовываться путем ингибирования ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-6 и ФНО- α миелопероксидаз и фактора активации тромбоцитов, снижением выработки лейкотриенов, подавлением продукции NO-макрофагами [6, 7]. В целом биологические эффекты тимохинона и других производных хинона отличаются значительным разнообразием, а для многих из них доказана плеiotропность действия. В связи с тем, что влияние хинонов на воспаление не ограничивается ингибированием ЦОГ-зависимого синтеза ПГ, они могут быть перспективны для создания синергичных противовос-

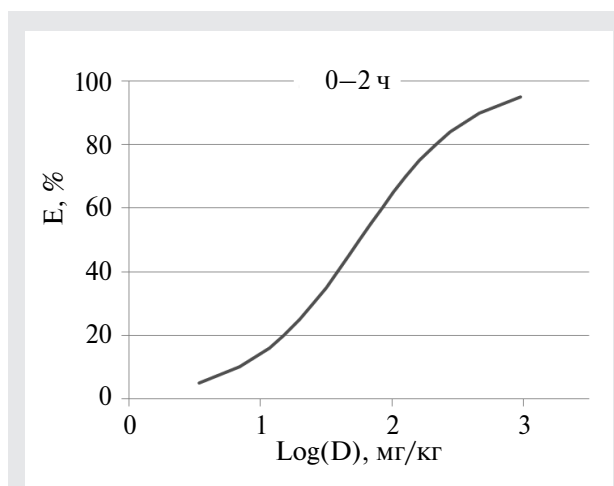


Рисунок 4 — Закономерность доза–противовоспалительный эффект тимохинона в лог-нормальных координатах на модели острого каррагенинового воспаления лапы у мышей в начальную фазу отека

палительных комбинаций, эффективность которых может оказаться выше таковой у НПВС.

Заключение. Результаты исследования показали, что 1,4-бензохинон и тимохинон обладают значительным противовоспалительным

эффектом и могут рассматриваться в качестве возможных индивидуальных противовоспалительных средств, а также как компоненты в составе синергичных противовоспалительных комбинаций и представляют интерес для дальнейших изысканий.

Список цитированных источников

1. Rainsford, K. D. Aspirin and Related Drugs / K. D. Rainsford // Taylor & Francis, London, 2004. — P. 242–245.
2. Myers, M. J. Molecular mechanism of action responsible for carrageenan-induced inflammatory response / M. J. Myers, C. M. Deaver, A. J. Lewandowski // Mol. Immunol. — 2019. — № 109. — P. 38–42.
3. Perspectives on medicinal properties of benzoquinone compounds / P. R. Dandawate [et al.] // Mini. Rev. Med. Chem. — 2010. — № 10(5). — P. 436–454.
4. Chandra, S. HIV-1 protease inhibitor induced oxidative stress suppresses glucose stimulated insulin release: protection with thymoquinone / S. Chandra, D. Mondal, K. C. Agrawal // Exp. Biol. Med. (Maywood). — 2009. — № 234. — P. 442–453.
5. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats / O. A. Badary [et al.] // Toxicology. — 2000. — № 143. — P. 219–226.
6. Mansour, M. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone / M. Mansour, S. Tornhamre // J. Enzyme Inhibit. Med. Chem. — 2004. — № 19. — P. 431–436.
7. El Gazzar, M. A. Thymoquinone suppresses in vitro production of IL-5 and IL-13 by mast cells in response to lipopolysaccharide stimulation / M. A. El Gazzar // Inflamm. Res. — 2007. — № 56. — P. 345–351.

Effect of 1,4-benzoquinone and thymoquinone on carragenine inflammation in mice

Rashkevich O. S., Vauchok A. U.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Anti-inflammatory properties of 1,4-benzoquinone and thymoquinone after a single intraperitoneal injection in a model of carrageenan paw edema in mice were studied. Tested quinone derivatives have a significant dose-dependent anti-inflammatory effect. The average effective dose of 1,4-benzoquinone calculated by the method of regression analysis in this model is 4.47 mg/kg; the average effective dose of thymoquinone is 57 mg/kg. 1,4-benzoquinone and thymoquinone may be of interest for further research as individual anti-inflammatory agents, as well as possible components in anti-inflammatory combinations.

Keywords: 1,4-benzoquinone, thymoquinone, diclofenac, NSAIDs, inflammation, mice, carrageenan.

Поступила 27.06.2022