

А.Ю. Иванова, О.С. Рашкевич

**ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТИМОХИНОНА
И ЕГО КОМБИНАЦИЙ С ДИКЛОФЕНАКОМ И ПРЕДНИЗОЛОНОМ
ПРИ КАРРАГЕНИНОВОМ ОТЕКЕ У МЫШЕЙ**

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. А.В. Волчек

Кафедра фармакологии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

A.Y. Ivanova, O.S. Rashkevich

**ANTI-INFLAMMATORY EFFECTIVENESS OF THYMOQUINONE
AND ITS COMBINATIONS WITH DICLOFENAC AND PREDNISOLONE
ON CARRAGEENAN PAW EDEMA IN MICE**

Tutor: PhD A.U. Vauchok

Department of Pharmacology

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Тимохинон показал значительный противовоспалительный эффект при однократном внутрибрюшинном введении на модели каррагенинового отека лапы у мышей. В дозе 50 мг/кг тимохинон ингибирует отек на $63,5 \pm 9,8\%$, ED₅₀ составляет 22 мг/кг. Противовоспалительный эффект комбинаторных сочетаний 5 мг/кг тимохинона с 0,5 мг/кг диклофенака и 5 мг/кг тимохинона с 5 мг/кг преднизолона превышал индивидуальные эффекты компонентов при изолированном применении.

Ключевые слова: тимохинон, диклофенак, преднизолон, синергизм, комбинация.

Resume. Thymoquinone demonstrates significant anti-inflammatory effect after a single intraperitoneal injection in a model of carrageenan paw edema in mice. The dose of thymoquinone 50 mg/kg inhibits $63,5 \pm 9,8\%$ of paw edema, ED₅₀ = 22 mg/kg. Anti-inflammatory effect of combinations 5 mg/kg thymoquinone with 0,5 mg/kg diclofenac and 5 mg/kg thymoquinone with 5 mg/kg prednisolone heighten than in isolated use of components.

Keywords: thymoquinone, diclofenac, prednisolone, synergism, combination.

Актуальность. Воспаление представляет собой типовой защитно-приспособительный процесс, возникающий в ответ на действие раздражителя-патогена. 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, гипергликемия, 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, что обусловлено 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.

В качестве потенциальных противовоспалительных агентов и компонентов противовоспалительных комбинаций большой интерес представляют производные хинона. По литературным данным, тимохинон подавляет окислительный стресс *in vitro* и *in vivo* на различных экспериментальных моделях атеросклероза, метаболического синдрома, воспаления, цитотоксичности [2, 3]. Тимохинон ингибирует NF-κB и p53-зависимые процессы, а также повышает экспрессию супероксиддисмутазы 1, каталазы, глутатионпероксидазы-2 [1]. Противовоспалительное действие тимохинона может реализовываться путем ингибирования ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-6 и ФНО-α миелопероксидаз и фактора активации тромбоцитов, снижением выработки лейкотриенов, подавления продукции NO макрофагами [4, 5]. В целом, биологические эффекты тимохинона отличаются значительным разнообразием и плейотропностью действия.

В связи с тем, что влияние тимохинона на воспаление не ограничивается ингибированием ЦОГ-зависимого синтеза ПГ, он может быть перспективен для создания синергичных противовоспалительных комбинаций, эффективность которых может оказаться выше таковой у классических противовоспалительных средств.

Цель: изучить противовоспалительную активность и эффективность тимохинона и его комбинаторных сочетаний с диклофенаком и преднизолоном.

Задачи:

1. На модели острого каррагенинового отека лапы у мышей определить противовоспалительные свойства тимохинона, комбинаций тимохинон+диклофенак и тимохинон+преднизолон.
2. Рассчитать показатели активности (ED_{50}) и эффективности (индексы ингибирования) тимохинона и комбинаций.

Материалы и методы. Противовоспалительные свойства производных хинона изучали в опытах на 84 белых инбредных мышцах-самцах массой 32-38 г на модели

острого каррагенинового отека. Ирритант лямбда-каррагенин приобретен в Sigma Aldrich, США. Субстанция тимохинона была предоставлена кафедрой радиационной медицины и химико-фармацевтических технологий химического факультета Белорусского государственного университета; использован диклофенак производства Берлин-Хеми АГ, Германия; преднизолон выпуска Биофарма, Украина. Подопытные и контрольные группы по 6 мышей формировали методом рандомизации по массе тела в качестве ведущего признака. За 40 минут до индукции воспаления животным внутрибрюшинно в объеме 0,4 мл / 10 г массы тела вводили препараты: тимохинон в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг; преднизолон в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг и 50 мг/кг, диклофенак в дозах 0,5 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг, а также комбинаторные сочетания тимохинона с диклофенаком и тимохинона с преднизолоном. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя. Воспаление вызывали введением 1% водного раствора λ каррагенина в объеме – 0,03 мл, под плантарный апоневроз задней правой лапы. Величину отека регистрировали в динамике ежечасно на протяжении 5 часов и спустя 24 часа по изменению толщины стопы, определяемой при помощи микрометрического устройства с точностью до 0,01 мм в условиях постоянного давления на область отека. Противовоспалительный эффект соединений оценивали по индексам ингибирования различных фаз воспалительной реакции в сравнении с плацебо, которые рассчитывали по формуле: $100 \times (S_d - S_p) / S_p$, где S_d и S_p - средние значения отека лапы соответственно для групп, получавших испытуемые препараты или плацебо. Полученные данные обрабатывали с использованием методов параметрической вариационной статистики. Эффективные дозы (ED_{16} - ED_{84}) субстанций определяли путем регрессионного анализа с использованием вычислительных возможностей компьютерной программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Индексы ингибирования воспалительного отека испытанных соединений и комбинаций представлены в таблице 1.

Классическое НПВС диклофенак дозозависимо ингибировало все фазы каррагенинового воспаления, его ED_{50} составило 14 мг/кг на данной модели (LD_{50} диклофенака у мышей при внутрибрюшном введении по данным литературы – 75 мг/кг).

Установлено, что тимохинон в дозах 5, 10 и 50 мг/кг в различные фазы острой воспалительной реакции угнетал отечную реакцию на флогоген на 21-65%. При высоком уровне качества аппроксимации данных (точность более 95%), рассчитанная среднеэффективная доза составила 22 мг/кг (LD_{50} тимохинона у мышей при внутрибрюшном введении по данным многих источников – 140 мг/кг).

В составе комбинаторного сочетания тимохинона с диклофенаком в массовых соотношениях 10 : 1 благодаря синергичному характеру взаимодействия противовоспалительное действие компонентов существенно усиливается. Так, комбинации 5 мг/кг тимохинона с 0,5 мг/кг диклофенака и 10 мг/кг тимохинона с 1 мг/кг диклофенака по противовоспалительной эффективности статистически значимо превосходили действие аналогичных доз диклофенака и тимохинона при их изолированном применении.

Табл. 1. Индексы ингибирования различных фаз каррагенинового воспаления лапы (в %) у мышей диклофенака, преднизолона, тимохинона и их комбинаций ($M \pm m$)

	Доза, мг/кг	Фазы воспалительного отека			
		0-2 ч	2-5 ч	0-5 ч	0-24 ч
Диклофенак	0,5	-6,9±6,3	-16,4±6,3	-13,3±5,9	-14,7±5,3
	5	-15,2±8,7	-19,0±5,3*	-17,7±5,9*	-18,9±5,8*
	10	-30,5±7,4*	-38,3±7,0*	-35,7±7,0*	-37,6±6,4*
Преднизолон	5	-17,2±6,4	-25,0±5,8*	-22,5±5,8*	-20,5±6,2*
	10	-35,8±7,2*	-43,0±7,6*	-40,6±7,4*	-39,9±7,3*
	50	-30,8±8,9*	-41,7±5,9*	-38,1±6,8*	-38,0±6,6*
Тимохинон	5	-23,3±7,3	-28,1±5,4*	-26,5±5,7*	-29,1±5,4*
	10	-17,9±11,6	-22,5±10,8	-21,0±10,9	-23,8±10,5
	50	-61,3±10,2*	-64,6±9,8*	-63,5±9,8*	-64,8±9,5*
Диклофенак + Тимохинон в соотношении 1 : 10	0,5 + 5	-32,6±9,7*	-46,3±8,4*	-41,8±8,6*	-45,5±8,2*
	1 + 10	-25,3±7,8*	-37,4±7,8*	-33,5±7,7*	-36,3±7,7*
Преднизолон + Тимохинон в соотношении 1 : 1	5 + 5	-51,2±9,3*	-54,5±8,4*	-53,4±8,6*	-54,1±8,7*
	10 + 10	-52,2±4,0*	-53,5±4,9*	-53,1±4,5*	-54,4±4,7*

Примечание. * - $p < 0,05$ в сравнении с плацебо по критерию Ньюмена-Келса; $n=6$

Эталонный ГКС преднизолон на использованной модели ингибировал все фазы воспаления, максимальная противовоспалительная эффективность препарата была достигнута при назначении 10 мг/кг и существенно не менялась при дальнейшем повышении дозы до 50 мг/кг. Предельная ингибирующая эффективность ГКС в отношении каррагенинового отека лапы мышей составила 40%. В составе комбинаторного сочетания тимохинона с преднизолоном в массовых соотношениях 1 : 1 благодаря синергичному характеру взаимодействия компонентов значительно возросла противовоспалительная активность и эффективность. Комбинации 5 мг/кг тимохинона с 5 мг/кг преднизолона и 10 мг/кг тимохинона с 10 мг/кг преднизолона по противовоспалительному действию достоверно превышали эффект аналогичных доз преднизолона и тимохинона при отдельном назначении.

Выводы:

1. Тимохинон обладает значительным противовоспалительным эффектом на модели острого каррагенинового отека у мышей. ED₅₀ тимохинона – 22 мг/кг. В максимальной испытанной дозе 50 мг/кг тимохинон ингибирует отек на 63,5±9,8%.

2. Сочетанное применение тимохинона совместно с классическими противовоспалительными средствами существенно усиливает действие последних. Противовоспалительный эффект комбинаторных сочетаний 5 мг/кг тимохинона с 0,5 мг/кг диклофенака, 10 мг/кг тимохинона с 1 мг/кг диклофенака и 5 мг/кг тимохинона с 5 мг/кг преднизолона, 10 мг/кг тимохинона с 10 мг/кг преднизолона превышал индивидуальные эффекты компонентов при изолированном применении.

Литература

1. Badary, O.A. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats / O.A. Badary [et al] // Toxicology. – 2000. – №143. – P.219–226.
2. 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.

3. Dandawate, P. R. Perspectives on medicinal properties of benzoquinone compounds / P.R. Dandawate [et al] // Mini Rev Med Chem. – 2010. – Vol. 10, № 5. – P.436–454.

4. 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.

5. 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.