

УДК 615.212:615.276:547.857.4

**ВЛИЯНИЕ КСАФУБЕНА НА АКТИВНОСТЬ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ И СОДЕРЖАНИЕ
ПРОСТАГЛАНДИНОВ ГРУППЫ ПГЕ₁ В ПЛАЗМЕ
КРОВИ**

**Киреев И.В., Самура Б.А., Литвинова О.Н.,
Волковой В.А.
Национальный фармацевтический университет, г.
Харьков**

Боль и воспаление являются наиболее распространенными симптомами, которые сопровождают течение большинства заболеваний. Для лечения этих симптомов используются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС). В основе механизма действия большинства НПВС лежит свойство ингибировать синтез и освобождение в организме простагландинов (ПГ) [1]. Под воздействием циклооксигеназы (ЦОГ) блокируются реакции арахидонового каскада и нарушается синтез простагландинов, тромбксана А₂, простаглицина, лейкотриенов, подавляет агрегацию тромбоцитов. Ведущую роль в развитии воспалительного процесса играют ПГЕ₁, простаглицин и тромбксан [2, 3, 4].

В регуляции процессов микроциркуляции и воспалительных реакций принимают участие кинины (брадикинин и каллидин), которые представляют собой низкомолекулярные пептиды. Особо важная роль в процессе образования кининов принадлежит протеолитическому ферменту калликреину, который действует в плазме крови в виде предшественника - прекалликреина (калликреиногена), превращающегося в калликреин в процессе реакции протеолиза под действием фактора Хагемана свертывающей системы крови [5, 6].

Однако большинство НПВС являются высокотоксичными, могут оказывать недостаточно эффективными и оказывать ряд побочных реакций: поражение антрального отдела желудка в виде эритемы слизистой, кровоизлияний, эрозий и язв, повышение уровня трансаминаз в сыворотке крови, вызывать пошатывание при ходьбе, головокружение, бессонницу, раздражительность, утомляемость, нарушение кроветворения (гемолитическая анемия, лейкопения вплоть до агранулоцитоза), повышение артериального давления и др. [7, 8]

В связи с этим, поиск более безопасных лекарственных средств обладающих анальгетическими и противовоспалительными свойствами остается актуальной проблемой современной экспериментальной фармакологии.

На основании проведенного фармакологического скрининга замещенных и аннелированных производных ксантина для доклинического изучения было отобрано соединение 105: 7-β-феноксиптил-8-(5-метилфурил)-2-аминоксантин (условное название – ксафубен), обладающего выраженной анальгетической и противовоспалительной активностями.

Целью работы было исследование влияния ксафубена на активность калликреин-кининовой системы, содержание простагландинов в плазме крови.

Работа выполнена по программе научно-исследовательских работ Национального фармацевтического университета по проблеме «Создание новых лекарственных препаратов» (№ государственной регистрации 0198U007008).

Материалы и методы исследования. Ксафубен представляет собой белый кристаллический порошок, без запаха, горького вкуса, хорошо растворим в воде, диметилфосфамиде, трудно растворим в этаноле, практически не растворим в эфире, хлороформе, температура плавления 140-142°C с разложением.

Определение содержания калликреиногена и калликреина проводили ферментным методом Т.С.Пасхиной и А.В.Кринской [9, 10, 11], который включает 2 этапа. Первый этап – отделение калликреина от остальных компонентов кининовой системы и других трипсиноподобных ферментов сыворотки крови с помощью ДЭАЭ – сефадекса А-50 при рН 7,0. Второй этап – измерение активности калликреина и калликреиногена проводили спектрофотометрически по скорости гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинин (БАЭЭ). Содержание калликреиногена и калликреина выражали в миллиединицах калликреина в 1 мл сыворотки крови и вычисляли по формуле:

$$\frac{D_{253}^{15} \times 3 \times 5 \times 100}{1,1 \times 15 \times 0,25}, \text{ где}$$

D_{253}^{15} – прирост оптической плотности в пробе

за 15 мин (при линейном ходе реакции); 1,1- D_{253}^{15} , соответствующая образованию 1мкмоль БА из БАЭЭ в 1 мл пробы; 3 – объем пробы в кювете, мл; 5 – объем неадсорбированной фракции, мл; 0,25 – объем сыворотки крови, взятой для анализа, мл; 15 – длительность инкубации, мин.

Радиоиммунологическое определение простагландинов ПГЕ₁ и их количественный подсчет проводили по методике и на реагентах фирмы «Clinical Assay» (США). В эксперименте использовали интактных белых крыс линии Вистар массой 160-180 г. Определение содержания ПГЕ₁ в плазме проводили на фоне воспалительной и болевой реакции. Экспериментальное воспаление вызывали субплантарным введением 0,1 мл 1% раствора каррагинина, болевую реакцию – внутрибрюшинным введением 0,75% раствора уксусной кислоты. Алюметоксифенилан вводили внутривентриально с помощью специального металлического зонда за 30 мин до введения флогогенного и альгогенного агентов. Забор крови проводили через 4 часа после внутривентриального введения исследуемых препаратов. Кровь у крыс забирали в соответствии с рекомендациями В.Д. Помойнецкого [12]. После эфирного наркоза крыс декапитировали, кровь отбирали в полиэтиленовые пробирки. Для предотвращения процессов биосинтеза и метаболизма простагландинов, при взятии и обработке крови пробирки находились на льду. В качестве антикоагулянта использовали этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) в концентрации 1 мг/мл крови. С целью блокирования в пробирках каскада превращений эйкозаноидов тромбоцитами в образцы плазмы добавляли ингибитор простагландин-синтетазы – раствор

ацетилсалициловой кислоты в объеме 0,01 мл 0,4% раствора на 1 мл крови. Плазму отделяли центрифугированием при 4°C и 2000 об/мин в течение 30 мин до полного осаждения тромбоцитов и хранили при температуре – 20°C в течение 2-3 дней. Экстракцию простагландинов ПГЕ₁ проводили согласно инструкции прилагаемой к набору. К 1 мл плазмы добавляли 3 мл петролейного эфира, а после удаления липидной фракции добавляли 5 мл раствора, содержащего этилацетат, изопропанол и 0,2 н хлористоводородной кислоты в соотношении 3:3:1. Встряхивали 15 секунд и добавляли 2 мл ацетилацетата и 3 мл дистиллированной воды. После центрифугирования отбирали органическую фазу в объеме 3 мл.

Колончатую хроматографию проводили методом последовательной элюации по В.М. Jaffe и соавт. [13] на колонках кремниевой кислотой смесью растворителей бензола, метанола и этилацетата в различных соотношениях. Полученные элюаты выпаривали в ротационном испарителе и сохраняли для проведения радиоиммунологического анализа не более 10-15 дней при температуре – 20°C. Для контроля выхода простагландинов с органической фазы после экскреции и хроматографического разделения простагландинов по сериям использовали Н₃-ПГ.

Концентрацию простагландинов ПГЕ₁ в плазме определяли радиоиммунологическим методом при помощи наборов, позволяющих с высокой чувствительностью исследовать содержание простагландинов. При построении стандартной кривой по величине радиоактивности в осадке рассчитывали процент связывания тритием меченых и немеченых ПГ в пробе. Для определения содержания простагландинов в диапазоне от 9,2 до 2400 мг/мл строилась стандартная кривая из 6 точек, для чего в 6 пробирок вместо проб добавляли определенное количество стандартного ПГ. На оси ординат откладывали процент связывания Н³-ПГ, на оси абсцисс – логарифм концентраций простагландинов ПГЕ₁, соответствующих определенному количеству связывания. Этапы радиоиммунологического анализа проводились согласно инструкции «Clinical Assay» (США). Подсчет импульсов проводили на сцинтиляционном счетчике в течение 2-5 мин. Результаты рассчитывали по калибровочной кривой, где по величине процента связывания для каждой пробы, определяемой по формуле:

$$B_n = \frac{CPM_n - NSB}{B_o - NSB} \cdot 100\%, \text{ где}$$

B_n – величина процента связывания для каждой пробы; CPM_n – количество импульсов в мин; NSB – неспецифическое и B_o – максимальное связывание.

Количество ПГЕ₁ определяли по калибровочной кривой и производили пересчет, учитывая размер пробы, подвергшейся экстрагированию. Для более точного расчета содержание ПГЕ₁ в пробах пользовались только линейной частью калибровочной кривой, соответствующей обычно 30-70% связывания. После определения количества простагландинов ПГЕ₁ порции экстракта, взятой для определения производили пересчет в концентрацию исходной пробы, учитывая размер пробы, подвергшейся экстрагированию; коэффициент эффективности экстрагирования, коэффициент разведения для порции экстракта, участвовавшей в определении. Конечные результаты выражали в нмоль/л.

При проведении экспериментальных исследований животные находились в стандартных условиях согласно с нормами и принципами Директивы Совета ЕС по вопросам защиты хребетных животных, которых используют для экспериментальных и других научных целей [14].

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, разницу считали достоверной при $p < 0,05$ [15].

Результаты и их обсуждение. Полученные экспериментальные данные приведены в табл.1. Установлено, что у крыс с экспериментальным каррагениновым отеком лапки наблюдали в плазме повышение уровня калликрейна на 51,2% и его плазменного предшественника калликреиногена на 38,5%.

Ингибирование калликрейна наблюдалось после введения ацетилсалициловой кислоты, при этом уровень его уменьшился на 19,1 % по сравнению с интактными крысами и на 70,3 % по сравнению с опытной группой. Под действием ксафубена содержание калликрейна было на 7 % меньше в сравнении с контролем (интактная группа) и на 58,2 % ниже, чем у крыс опытной группы.

Таблица 1. Влияние ксафубена и ацетилсалициловой кислоты на содержание калликрейна и калликреиногена в плазме крови у крыс в норме и в условиях экспериментального воспаления

Условия Опыта	Доза мг/кг	Содержание калликрейна		Содержание калликреиногена	
		МЕД/мл	% к контролю	МЕД/мл	% к контролю
Контроль (интактные животные)	-	85,6±3,46**	100	244,7±9,18**	100
Опыт (каррагениновый отек)	-	129,5±6,35*	151,2	338,8±14,74*	138,5
Ацетилсалициловая кислота	100	69,3±5,73**	80,9	431,3±11,8**	176,2
Каррагениновый отек+ ацетилсалициловая кислота	100	77,9±6,38**	91,0	452,5±16,34**	184,9
Ксафубен	32,0	79,6±6,71**	93,0	269,7±5,59**	110,2
Каррагениновый отек + ксафубен	32,0	88,5±5,29**	103,3	345,7±8,18*	141,3

Примечание. * - достоверно по отношению к контролю $p < 0,05$; ** - достоверно по отношению к опыту $p < 0,05$;

Под влиянием ацетилсалициловой кислоты содержание калликреиногена в плазме крови интактных крыс увеличилось на 76,2 %, в то время как действием ксафубена у крыс обеих экспериментальных групп практически не отличалось от таковой контрольной и опытной групп в аналогичных условиях.

Таким образом, новое фармакологическое вещество ксафубен ингибирует процесс кининогенеза и, в отличие от ацетилсалициловой кислоты, предотвращает рас-

Таблица 2. Влияние ксафубена, аспирина, мелоксикама и диклофенака на содержание ПГЕ₁ в плазме крыс с экспериментальным каррагениновым отеком

Условия опыта	Доза, мг/кг	Содержание ПГЕ ₁ в плазме крови	
		нмоль/л	% к контролю
Контроль /интактные/	-	7,72 ± 1,08	100
Каррагениновый отек	-	13,89 ± 1,27*	179,9
Ксафубен	32,0	1,28 ± 0,34*	16,6
Ацетилсалициловая кислота	100,0	1,12 ± 0,11*	14,5
Диклофенак	8,0	1,48 ± 0,43*	19,2

Примечание. * - достоверно по отношению к контролю $p < 0,05$

Под действием ксафубена уровень простагландинов уменьшился на 63,3% ($p < 0,05$) по сравнению с второй группой с каррагениновым отеком лапки у крыс. Под действием ацетилсалициловой кислоты и диклофенака также наблюдали снижение содержания простагландинов в плазме на 65,4% и 60,7%, соответственно, по сравнению с опытными животными второй группы. Значительное повышение активности ацетилсалициловой кислоты над диклофенаком связано, вероятно, с особенностями действия на циклооксигеназу: ацетилсалициловая кислота вызывает медленное необратимое инактивирование фермента, в то время как диклофенак является конкурентным ингибитором энзима.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить корреляционную зависимость между выраженными антиэкссудативными свойствами ксафубена и его способностью активно влиять на количество ПГЕ в плазме крови крыс с каррагениновым отеком.

Выводы

1. Ксафубен ингибирует процесс кининогенеза и, в отличие от ацетилсалициловой кислоты, предотвращает расходование компонентов калликреин-кининовой системы.
2. Под действием ксафубена содержание простагландинов уменьшилось на 63,3 % по сравнению группой животных с экспериментальным каррагениновым отеком лапки у крыс.
3. Полученные результаты позволяют рекомендовать ксафубен для дальнейшего изучения фармакологической активности и безопасности с перспективой разработки препарата для лечения болевых и воспалительных симптомов различной этиологии.

ходование компонентов калликреин-кининовой системы. Уменьшение скорости реакции превращения калликреиногена в калликреин является фактором, уменьшающим образование медиатора воспаления брадикинина.

Учитывая патогенетическую роль ПГЕ в развитии воспалительного процесса, было изучено влияние ксафубена на уровень ПГЕ₁. Выявлено, что уровень ПГЕ₁ в плазме крови у крыс второй группы с каррагениновым отеком лапки (табл. 2) увеличился на 79,9 % ($p < 0,05$).

и диклофенака на содержание ПГЕ₁ в плазме крыс с

Список литературы

1. Ferraira, S.H. Prostaglandins peripheral and central analgesia [Text]// Advances in Pain. Research and Therapy. – 2000. – N 5. – P. 626-634.
2. Энциклопедия лекарств.– 12-й выпуск [Текст]/ Гл. ред. Г.Л.Вышковский.–М.: РЛС-2005, 2004.–1440 с.
3. Ku, E.C., Prostaglandin E₁ a potencial mediator of inflammatory reponce [Text] / E.C.Ku, T.M. Waswary // Biochem. Rew. Pharmacol. – 2001. – N 11. – P. 241-245/
4. Goldstein, J.L. Reduced risk of upper gastrointestinal ulcer complications with celecoxib, a novel COX-2 inhibitor.[Text] / J.L.Goldstein, F.E.Silverstein, N.M. Agrawal et.al// Am J.Gastroenterol. – 2000. – Vol. 95, № 2, – P. 1681-1690.
5. Простагландины [Текст] / Под ред. И.С. Ажгихина.– М.: Медицина, 1998. – 416 с.
6. Byczkowski, J.I. Inhibition of state respiration and prostaglandin β -oxydation in rat liver mitochondria treated with some anthypyretic drucs [Text] / J.I.Byczkowski, I.K. Korolkiewicz // Clin. Pharmacol. – 2003. – Vol. 34, N 6. – P. 33-35.
7. Каратеев, А.Е. НПВП-ассоциированное заболевание желудочно-кишечного тракта при ревматизме в России [Текст] /А.Е.Каратеев, Н.Н.Коновалова, А.А.Литовченко и др. // Клин. мед. – 2005. – № 5. – С. 33-38.
8. Сороцкая, В.Н. Желудочно-кишечные осложнения как одна из причин смерти больных ревматическими заболеваниями [Текст] / В.Н.Сороцкая, А.Е. Каратеев // Научно-практическая ревматология. – 2005. – № 4. – С. 34-37.
9. Доклінічні дослідження лікарських засобів. [Текст] / За ред. О.В.Стефанова.-К.: Видавничий дім “Авіцена”, 2001.-528 с.
10. Пасхина, Т.С. Калликреин плазмы крови – новые функции [Текст] // Биохимия.–1976.–Т. 41, №8. – С. 347.
11. Пасхина, Т.С. Упрощенный метод определения калликреиногена и калликреина в сыворотке (плазме) крови человека в норме и при некоторых патологических со-

стояниях [Текст] / Т.С. Пасхина, А.В. Кринская // Вопр.мед.химии. – 1974. – Т. 20, № 6. – С. 660-663.

12. Методические рекомендации к количественному анализу простагландинов, тромбоксана, простаглицина и циклических нуклеотидов в биологических жидкостях [Текст] / Под ред. А.М. Эфендиева, В.Д. Помойнецкого.– МЗ Азерб.ССР, Баку. – 1984. – 42 с. (60 Ф).

13. **Jaffe, В.М** Radioimmunoassay mesurement of prostaglandin E, A and F in human plasma [Text] / В.М.Jaffe, Н.Р.Вernham, С.В.Parker // J.Clin. Invest. – 1973.–Vol.52.– P. 398-405.

14. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / Розроблено робочою групою Конгресу під проводом чл.-кор. НАН і АМН України О.Г.Резнікова [Текст] // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8. – № 1. – С.142–145

15. **Лапач, С.Н.** Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL [Текст] / С.Н.Лапач, А.В.Чубенко, П.Н. Бабич // К.: Морион, 2000.-320 с.

УДК 615.212:615.276:547.857.4

ВЛИЯНИЕ КСАФУБЕНА НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ КИНИНОВОЙ СИСТЕМЫ И СОДЕРЖАНИЕ ПРОСТАГЛАНДИНОВ ГРУППЫ ПГЕ₁ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Киреев И.В., Самура Б.А., Литвинова О.Н., Волковой В.А.

Изучено влияние ксафубена на активность протеолитических ферментов кининовой системы и содержание простагландинов. Установлено, что ксафубен ингибирует процесс кининогенеза и, в отличие от ацетилсалициловой кислоты, предотвращает расщепление компонентов калликреин-кининовой системы, а также уменьшает содержание простагландинов на 63,3% по сравнению в сравнении с экспериментальной группой крыс с каррагениновым отеком лапки. Полученные результаты позволяют рекомендовать ксафубен для дальнейшего изучения активности и безопасности с перспективой разработки препарата для лечения болевых и воспалительных симптомов различной этиологии.

Ключевые слова: ксафубен, протеолитические ферменты кининовой системы, простагландины группы ПГЕ₁

УДК 615.212:615.276:547.857.4

ВПЛИВ КСАФУБЕНА НА АКТИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ КІНІНОВОЇ СИСТЕМИ ТА ВМІСТ ПРОСТАГЛАНДІНІВ ГРУПИ ПГЕ₁ В ПЛАЗМІ КРОВІ

Кіреєв І.В., Самура Б.А., Литвинова О.М., Волковий В.А.

Вивчений вплив ксафубену на активність протеолітичних ферментів кінінової системи і вміст простагландинів. Встановлено, що ксафубен інгібує процес кініногенезу і, на відміну від ацетилсалицилової кислоти, запобігає витраті компонентів калікреїн-кінінової системи, а також зменшує вміст простагландинів на 63,3% у порівнянні з експериментальною групою щурів з карагениновим набряком лапки. Отримані результати дозволяють рекоме-

ндувати ксафубен для подальшого вивчення активності і безпеки з перспективою розробки препарату для лікування болевих і запальних симптомів різної етіології.

Ключові слова: ксафубен, протеолітичні ферменти кінінової системи, простагландини групи ПГЕ₁

UDC 615.212:615.276:547.857.4

INFLUENCE OF XANBUFEN ON ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES OF KININIC SYSTEM AND CONTENTS OF PROSTAGLANDINUMS PGE₁ IN BLOOD PLASMA

Kireyev I.V., Samura B.A., Litvinova O.N., Volkovoy V.A.

The influence of xanfubfen on activity of proteolytic enzymes of kininic system and contents of prostaglandinums is investigated. Fixed, that xanfubfen inhibits process of kininogenesis and, as against Acetum Acetylsalicylicum, prevents expenditure of components of kallikrein-kininic system, and also reduces contents of prostaglandinums by 63,3 % in comparison with experimental rats with carragenin's edema of pad. Obtained results allow to recommend xanfubfen for further study of activity and safety for working up medications for treatment of painful and inflammatory signs of various etiology.

Key words: xanfubfen, proteolytic enzymes of kininic system, prostaglandinums PGE₁.