

## ВЛИЯНИЕ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА НА АНАЛЬГЕЗИРУЮЩИЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТЫ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Волощук Н.И., Таран И.В., Конюх С.А.

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Винница, Украина

*Цель исследования: определение влияния H<sub>2</sub>S на анальгезирующий и противовоспалительный эффекты диклофенака натрия.*

*Анальгезирующий и противовоспалительный эффекты донора H<sub>2</sub>S (1,5 мг/кг в/бр) и диклофенака (8 мг/кг в/жел) изучались на моделях электрической стимуляции, формалинового и каррагенинового отеков.*

*Донор H<sub>2</sub>S уменьшал проявления воспалительного процесса и оказывал умеренное антиноцицептивное действие у интактных животных и выраженное анальгетическое действие при экспериментальном воспалении. Его введение усиливало эффекты диклофенака натрия.*

*Способность H<sub>2</sub>S модулировать фармакодинамику НПВС может быть перспективным направлением повышения эффективности и безопасности фармакотерапии препаратами этой группы.*

**Ключевые слова:** *сульфид водорода, диклофенак натрия, формалиновый тест, каррагениновый отек, противовоспалительное, анальгезирующее действие.*

Эффективное и безопасное лечение болевых синдромов остается приоритетным направлением научных исследований во всем мире. Наряду с поиском и созданием новых анальгезирующих средств достаточно перспективным является более рациональное использование уже существующих препаратов, которому предшествует тщательное изучение различных факторов (как экзо-, так и эндогенного характера), способных модулировать фармакодинамические и фармакокинетические параметры лекарственных средств. Среди этих факторов вызывает интерес такая вазоактивная молекула, как сульфид водорода (H<sub>2</sub>S). В арсенале биологических эффектов сульфида водорода описаны: участие в регуляции сосудистого тонуса, нейротрансмиссии, инотропной функции миокарда, продукции инсулина и т.п. [9, 13, 16]. Этот физиологический мессенджер, наряду с простагландинами, липоксинами и др., играет важную роль в обеспечении цитопротекции желудка. Было показано, что эндогенный H<sub>2</sub>S защищает слизистую желудка при различных моделях экспериментальных язв у крыс, в том числе индуцированных нестероидными противовоспалительными средствами (НПВС) [3, 14, 17]. В литературе встречаются сведения об участии этой молекулы в модулировании воспалительного процесса и перцепции, однако этот вопрос остается до конца не выясненным, поскольку данные литературы во многом противоречат друг другу [5, 8, 9]. Остаются неизвестными механизмы реализации этих эффектов, а также влияние сульфида водорода на фармакологическую активность лекарственных средств с анальгезирующим и противовоспалительным действием.

Целью проводимого исследования было определение влияния сульфида водовода на анальгезирующий и противовоспалительный эффекты диклофенака натрия.

### Материалы и методы

Исследования проведены на самцах белых нелинейных крыс массой 200-220 г и мышей массой 25-29 г. Животные содержались на стандартном рационе в условиях вивария Винницкого национального медицинского университета им. Н. И. Пирогова с доступом к воде *ad libitum*. Температура воздуха 22±2°C, относительная влажность воздуха 40-60%, светлый/темный цикл: 12/12 часов. Все исследования проведены согласно Конвенции Совета Европы

от 18.03.1986 г. о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы. Крысам I и III групп внутрибрюшинно на протяжении 5 дней вводили донор сульфида водовода NaHS (Sigma, США) на фосфатном буфере (pH 7,4) в условно-терапевтической дозе 1,5 мг/кг, определенной ранее [4]. Животным II и IV групп вводили эквивалентные количества растворителя. Диклофенак натрия вводили животным II и III групп внутривенно однократно в средней эффективной дозе 8 мг/кг. IV группа (контроль) получала соответствующее количество 1% крахмального геля.

Моделью ноцицептивной реакции служил тест электрического раздражения у крыс, который воспроизводили в специальной плексигласовой камере, используя аппарат ЭСЛ-2, который генерировал электрические импульсы с частотой 100 Гц, длительностью 5 мсек. и задержкой 5 мсек. За порог болевой чувствительности (ПБЧ) принимали минимальное напряжение электрического тока, вызывавшее ноцицептивную реакцию у крыс, которую регистрировали по вокализации, иммерсии хвоста и (или) отдергиванию лапок от токопроводящей поверхности дна камеры [1]. Обезболивающий эффект исследуемых веществ определяли, сравнивая исходный показатель с таким через 1, 2, 4 и 6 часов после их введения. Для оценки центрального и периферического компонентов антиноцицептивного эффекта использовали модель формалинового теста [6, 12]. Крысам субплантарно в правую нижнюю конечность вводили 0,1 мл 5% раствора формалина. Ноцицептивная реакция проявлялась в две стадии в виде поднятия и периодического покачивания лапы, а также ее покусывания или облизывания. Первая (центральная) фаза болевой перцепции возникала сразу же после короткого латентного периода вследствие непосредственного химического раздражения болевых рецепторов и длилась от 3 до 10 минут (в среднем 4-5 мин.). После первой фазы наступал латентный период второй фазы (20-30 мин.), который характеризовался успокоением животного и временным исчезновением боли. Развивалось асептическое воспаление лапки крысы и проникновение в его очаг биологически активных веществ (простагландинов, брадикинина и др.), что сопровождалось повышением проницаемости сосу-

дов, гиперемией, отеком конечности и появлением признаков болевой чувствительности. Наблюдение за животными проводилось на протяжении 60 мин. после введения формалина. Изменения длительности латентного периода 2 фазы и длительности болевой реакции в этой фазе свидетельствовали о силе обезболивающего действия изучаемых соединений.

Противовоспалительное действие оценивали по антиэкссудативной активности на моделях формалинового и карагенинового отеков у крыс и мышей, соответственно. Формалиновый отек вызывали, как описано выше, карагениновый отек воспроизводили сублантарным введением 0,1 мл 1% раствора карагенина (Sigma) в правую заднюю конечность животного [2]. Исследуемые соединения вводили внутривентриально за 30 мин. до сублантарного введения флогогенов. Наблюдение за развитием простагландинового отека у животных проводили спустя 3 часа (пик развития) после введения карагенина. Объем стоп измеряли при помощи механического онкометра. Антиэкссудативную активность (АЭА) определяли по степени уменьшения отека в опытных группах в сравнении с контролем и выражали в процентах, рассчитывая по формуле:

$$АЭА = \frac{\Delta V_k - \Delta V_{оп}}{\Delta V_k} \times 100\%,$$

где АЭА – антиэкссудативная активность (в %);  $\Delta V_k$  – средняя разница в объеме между отеком и здоровой лапами в группе контроля;  $\Delta V_{оп}$  – средняя разница в объеме между отеком и здоровой лапами в опытной группе.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 6.0. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ( $M \pm m$ ). Сравнение выборок проводилось с использованием параметрического критерия Стьюдента, непараметрического U-критерия Манна-Уитни и коэффициента Фишера. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Нами установлено (рисунок 1), что введение донора сульфида водовода вызывало умеренное анальгезирующее действие на модели электрического раздражения, что проявлялось более высокими значениями ПБЧ у крыс по сравнению с таковыми до начала эксперимента (на 17,4%; 24,8%; 23,3% и 21,6% на 1-м, 2-м, 4-м и 6-м часах исследования, соответственно). При этом анальгезирующее действие диклофенака натрия на фоне предварительного введения натрия гидросульфида было более выраженным, чем монотерапия, особенно на поздних этапах эксперимента, и достигало статистически достоверных значений ( $p < 0,05$ ) на 4-м и 6-м часах после введения НПВС (42,5% и 57,3% против 36,5% и 30,7%, соответственно).

Дополнительные данные о способности натрия гидросульфида усиливать антиноцицептивный эффект диклофенака натрия мы получили на модели формалинового теста (таблица 1). Было выявлено незначительное влияние натрия гидросульфида на первую фазу болевой реакции, характеризующуюся центральными механизмами перцепции. В то же время во второй фазе (воспалительной) его анти-

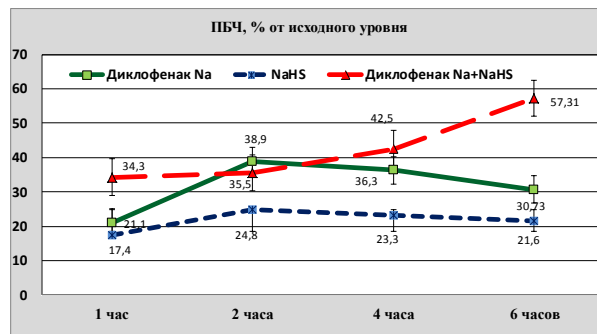


Рисунок 1. – Изменения порога болевой чувствительности при электрическом раздражении на фоне введения натрия гидросульфида, диклофенака натрия и их комбинаций

ноцицептивное действие было более выраженным, что проявлялось достоверным ( $p < 0,05$ ) удлинением латентного периода боли (на 28,3%) и укорочением продолжительности болевой реакции (на 31,7%). Кроме того, дополнительное введение донора сульфида водовода способствовало более выраженному антиноцицептивному эффекту диклофенака натрия, о чем свидетельствуют достоверно большее в сравнении с эффектом монотерапии исследуемым НПВС увеличение длительности латентного периода II фазы и уменьшение в той же фазе времени болевой реакции: на 29,3% и 40,2%, соответственно ( $p < 0,05$ ).

Таблица 1. – Влияние сульфида водорода на обезболивающую активность диклофенака натрия на модели формалинового теста ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Препарат	I фаза (мин.)		II фаза (мин.)	
	Латентный период	Болевая реакция	Латентный период	Болевая реакция
Контроль	1,82±0,13	5,52±0,33	16,3±1,23	19,5±2,94
Диклофенак-натрий	2,27±0,33	5,06±0,55	24,6±1,37*	11,9±1,07*
NaHS	2,02 ± 0,27	5,17±0,76	20,92±1,04*#	13,3±2,68*#
Диклофенак-натрий + NaHS	2,58±0,32*	4,90±0,69	31,8±2,99*#♯	7,12±1,17*#♯

Примечание: \* - статистически достоверные ( $p < 0,05$ ) различия относительно группы «контроль»; # - статистически достоверные ( $p < 0,05$ ) различия относительно группы «диклофенак-натрий»; ♯ - статистически достоверные ( $p < 0,05$ ) различия относительно группы «NaHS»

Таким образом, мы установили, что сульфиду водорода присуща умеренная анальгезирующая активность, а также способность усиливать и удлинять обезболивающий эффект диклофенака натрия, которые были более выраженными в условиях моделирования воспалительного процесса. По нашему мнению, это может быть связано с выраженным антиоксидантным действием и мембраностабилизирующими свойствами сульфида водовода [3, 4, 7], а также его антиэкссудативным действием. Не исключено, что уменьшение воспалительного отека устраняет механическое раздражение болевых рецепторов в очаге воспаления.

Для подтверждения этого предположения в следующей части эксперимента мы исследовали влияние сульфида водовода и его комбинации с диклофенаком натрия на выраженность воспалительного процесса. Результаты исследований противовоспалительного действия исследуемых соединений (таблица 2) показали, что донор  $H_2S$  оказывал существенное противовоспалительное действие, о чем свидетельствует уменьшение степени отека конечности в группе

мышей на модели каррагенинового отека в сравнении с животными контрольной группы. Антиэкссудативная активность этого соединения составляла 32,3%. Также нами отмечено, что введение сульфида водорода животным, которые получали в качестве противовоспалительного агента диклофенак, усиливало антифлогенное действие последнего. Противоотечная активность этой комбинации составила 81,9%, тогда как монотерапия диклофенаком уменьшила степень каррагенинового отека только на 54,9%. Аналогичные результаты (противоотечное действия сульфида водорода и усиление антифлогенной активности диклофенака натрия) наблюдались на модели формалинового отека у крыс. Противоотечная активность при совместном применении диклофенака натрия и NaHS была в 1,7 раза больше, чем диклофенака (таблица 2).

**Таблица 2.** – Антиэкссудативная активность натрия сульфида водорода, диклофенака натрия и их комбинации (n=10)

№ группы	Условия опыта	Антиэкссудативная активность, %	
		Каррагениновый отек	Формалиновый отек
I	NaHS	32,3%	21,7%
II	Диклофенак натрия	54,9%	38,2%
III	Диклофенак натрия +NaHS	81,9%	67,9%
IV	Контроль	0%	0%

Выявленное нами противовоспалительное и анальгезирующее действие сульфида водорода сопоставимо с патогенезом противовоспалительного эффекта исследуемого НПВП, что способствует его синергичному влиянию на противовоспалительный и антиноцицептивный эффекты диклофенака натрия. Однако не исключено существование также и других механизмов терапевтического действия этой биологически активной молекулы на прояв-

ления воспалительного процесса и перцепцию, в частности, уменьшение продукции провоспалительных цитокинов, содержания цАМФ, модуляции NMDA-рецепторов, воздействия на потенциал-зависимые К-АТФ каналы и т.д. [7, 10, 11, 15].

### Выводы

1. Донор сульфида водорода при его 5-дневном внутрибрюшинном введении в условно терапевтической дозе (1/20 LD50) крысам оказывает слабо выраженное анальгетическое действие у интактных животных и вызывал статистически значимый антиноцицептивный эффект в условиях асептического воспаления (формалинового теста).

2. На моделях воспалительных процессов (формалинового и каррагенинового отека) у мышей и крыс, соответственно, донор сульфида водорода вызывает выраженное антиэкссудативное действие.

3. Натрия гидросульфид усиливает антиноцицептивное действие диклофенака натрия как на модели электрического раздражения у крыс, так и в воспалительной фазе формалинового теста. В то же время совместное введение с NaHS существенно усиливает противовоспалительный эффект диклофенака натрия в условиях простагландин-индуцированного воспалительного процесса (карагенинового и формалинового отеков).

### Заключение

Таким образом, дальнейшие детальные исследования влияния сульфида водорода на фармакодинамику НПВП, а также исследования его влияния на проявления побочных реакций препаратов этой группы могут быть перспективными направлениями повышения эффективности и безопасности фармакотерапии болевых и воспалительных синдромов.

### Literatura

1. Гацура, В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В. В. Гацура // М.: Медицина, 1974. – 142 с.
2. Доклинические исследования лекарственных средств: Метод. рекомендации / Под ред. член-корр. АМН Украины А. В. Стефанов. - К.: ИД «Авиценна», 2001. - С. 292-301.
3. Волошук, Н. І. Вираженість гастротоксичної дії диклофенаку натрію на тлі дефіциту та надлишку гідроген сульфід у експерименті / Н. І. Волошук, І. В. Таран // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014, №4-5(40). - С.17-24.
4. Волошук, Н. І. Гостра токсичність гідроген сульфід та його вплив на протизапальний ефект диклофенаку в експерименті / Н. І. Волошук, І. В. Таран // Медична хімія. – 2011. – Т.13, №4 (49). – С. 88-91
5. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide / M. Lee [et al.] // Neurobiology of Aging. - 2009. – Vol.30. – P. 1523–1534.
6. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test / J. E. Torres-Lopez [et al.] // Life Sci. – 2002. – Vol. 70, №14. – P.1669-1676.
7. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia–reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. / S. Jha [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2008. – Vol.295. – P.H801–H806.
8. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation / R. C. Zanardo [et al.] // FASEB J. – 2006. – Vol. 20. – P. 2118–2120.
9. Hydrogen sulphide - a novel mediator of inflammation? / L. Li, M. Bhatia, P. K. Moore // Curr. Opin. Pharmacol. – 2006.
1. Gacura, V. V. Metody' pervichnogo farmakologicheskogo issledovaniya biologicheskii aktivny'x veshhestv / V. V. Gacura // М.: Medicina, 1974. – 142 s.
2. Doklinicheskie issledovaniya lekarstvenny'x sredstv: Metod. rekomendacii / Pod red. chlen-korr. AMN Ukrainy' A. V. Stefanov. - K.: ID «Avicenna», 2001. - S. 292-301.
3. Voloshuk, N. I. Virazhenist' gastrotoksichnoi dii diklofenaku natriyu na tli deficitu ta nadlishku gidrogen sul'fidu v eksperimenti / N. I. Voloshuk, I. V. Taran // Farmakologiya ta likars'ka toksikologiya. – 2014, №4-5(40). - S.17-24.
4. Voloshuk, N. I. Gostra toksichnist' gidrogen sul'fidu ta jogo vpliv na protizapal'nij efekt diklofenaku v eksperimenti / N. I. Voloshuk, I. V. Taran // Medichna khimiya. – 2011. – T.13, №4 (49). – S. 88-91
5. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide / M. Lee [et al.] // Neurobiology of Aging. - 2009. – Vol.30. – P. 1523–1534.
6. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test / J. E. Torres-Lopez [et al.] // Life Sci. – 2002. – Vol. 70, №14. – P.1669-1676.
7. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia–reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. / S. Jha [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2008. – Vol.295. – P.H801–H806.
8. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation / R. C. Zanardo [et al.] // FASEB J. – 2006. – Vol. 20. – P. 2118–2120.
9. Hydrogen sulphide - a novel mediator of inflammation? / L. Li, M. Bhatia, P. K. Moore // Curr. Opin. Pharmacol. – 2006.

- L. Li, M. Bhatia, P. K. Moore // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 6. - N2. – P.125-129.
10. Kimura, H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor / Kimura, H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2000. – Vol. 267. – P. 129–133.
11. Kimura, Y. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria / Y. Kimura, Y. Goto, H. Kimura // *Antioxid. Redox Signal.*– 2010. – Vol.12. - N1. – P.1-13.
12. Lee, I.-O. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats / I.-O. Lee, Y.-S. Jeong // *J. Korean Med. Scitnces.* – 2002. – Vol.17. – P.81-85.
13. Łowicka, E. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Łowicka, J. Beltowski // *Pharmacologicalreports.* – 2007. – Vol.59. – P.4-24.
14. Gastroprotective effect of NAHS against mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion injury in rat / S. A. Mard [et al.] // *Digestive Diseases and Sciences.* - 2012. – Vol. 57(6). - P.1496–1503.
15. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest / S. Carballal [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2011. – Vol.50. – P.196–205.
16. Synthesis and Biological Effects of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S): Development of H<sub>2</sub>S-Releasing Drugs as Pharmaceuticals / G. Caliendo [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 2010. - Vol. 53, No. 17. – P. 6275–6286
17. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats / J. L. Wallace [et al.] // *FASEB Journal.* - 2007. – Vol. 21(14). – P. 4070–4076.
- Vol. 6. - N2. – P.125-129.
10. Kimura, H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor / Kimura, H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2000. – Vol. 267. – P. 129–133.
11. Kimura, Y. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria / Y. Kimura, Y. Goto, H. Kimura // *Antioxid. Redox Signal.*– 2010. – Vol.12. - N1. – P.1-13.
12. Lee, I.-O. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats / I.-O. Lee, Y.-S. Jeong // *J. Korean Med. Scitnces.* – 2002. – Vol.17. – P.81-85.
13. Łowicka, E. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Łowicka, J. Beltowski // *Pharmacologicalreports.* – 2007. – Vol.59. – P.4-24.
14. Gastroprotective effect of NAHS against mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion injury in rat / S. A. Mard [et al.] // *Digestive Diseases and Sciences.* - 2012. – Vol. 57(6). - P.1496–1503.
15. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest / S. Carballal [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine.* – 2011. – Vol.50. – P.196–205.
16. Synthesis and Biological Effects of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S): Development of H<sub>2</sub>S-Releasing Drugs as Pharmaceuticals / G. Caliendo [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 2010. - Vol. 53, No. 17. – P. 6275–6286
17. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats / J. L. Wallace [et al.] // *FASEB Journal.* - 2007. – Vol. 21(14). – P. 4070–4076.

## INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATRY EFFECTS OF DICLOFENAC SODIUM IN EXPERIMENTS

*Voloshchuk N.I., Taran I.V., Konyukh S.A.*

Educational Establishment “Vinnitsa National Pirogov Memorial Medical University”, Vinnitsa, Ukraine

*Aim of the study: to determine the influence of H<sub>2</sub>S on the analgesic and anti-inflammatory effects of diclophenac sodium. Materials and methods. Analgesic and anti-inflammatory effect of the donor of H<sub>2</sub>S (1,5 mg/kg i.p.), diclofenac (8 mg/kg i.g) and their combinations was studied during electric pain stimulation, formalin test and carrageenan edemas.*

*Results. The donor of H<sub>2</sub>S minimized inflammatory process, caused moderate antinociceptive effect in intact animals, and more significant analgesic effect in experimental inflammatory processes. Its introduction increased analgesic and anti-inflammatory actions of diclofenac sodium.*

*Conclusion. The ability of H<sub>2</sub>S to modulate pharmacodynamics of NSAIDs may be a promising way of increasing the effectiveness and safety of pharmacotherapy with drugs of this group.*

**Key words:** *hydrogen sulfide, diclophenac sodium, formalin test, carrageenan edema, analgesic, anti-inflammatory effects.*

Адрес для корреспонденции: e-mail: voloshchukn@rambler.ru

Поступила 05.02.2015