

ВЛИЯНИЕ ДИМЕФОСФОНА И КСИДИФОНА НА МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН И ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ КРЫС НА МОДЕЛИ “ПУЛЬС-ТЕРАПИИ” ПРЕДНИЗОЛОНОМ

И. Х. Валеева, Л. Е. Зиганшина, З. А. Бурнашова, А. У. Зиганшин¹

В экспериментах на крысах изучены показатели минерального обмена, перекисное окисление липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантных ферментов при введении преднизолона в дозе 100 мг/кг внутривнутрибрюшинно в течение 3 дней (экспериментальный аналог “пульс-терапии” в клинике). Преднизолон усиливает экскрецию оксипролина и неорганического фосфата с мочой, повышает интенсивность ПОЛ и антиоксидантную активность сыворотки крови, снижает уровень церулоплазмينا и активность каталазы в крови. Профилактическое введение димефосфона (208 мг/кг внутрь) и ксидифона (45 мг/кг внутрь) предупреждает индуцированную преднизолоном активацию ПОЛ. Димефосфон, в отличие от ксидифона, предупреждает повышение экскреции оксипролина и неорганического фосфата, вызванное преднизолоном.

Ключевые слова: глюкокортикостероиды, перекисное окисление липидов, димефосфон, ксидифон (этидронат)

ВВЕДЕНИЕ

Глюкокортикостероиды (ГКС) являются самыми эффективными из существующих в настоящее время противовоспалительных средств. Однако их длительный прием приводит к развитию многочисленных побочных эффектов. ГКС угнетают костеобразование, способствуют потере кальция с мочой, снижают абсорбцию кальция в желудочно-кишечном тракте, усиливают процессы костной резорбции [6, 8]. Опасность развития тяжелых осложнений, формирования гормональной зависимости и неэффективность терапевтической дозы ГКС явились основанием для разработки альтернативных методов применения системных ГКС (альтернирующих и интермиттирующих схем лечения). Одним из перспективных направлений клинического применения ГКС является метод так называемой “пульс-терапии” (ПТ) с целью экстренной помощи больным с активным иммуновоспалительным процессом и быстрейшего купирования аллергического состояния [4, 11, 12]. Эффективность ПТ — внутривенного введения преднизолона в дозе 20 – 1000 мг [10] или метилпреднизолона по 1 г в течение 3-х дней показана при многих заболеваниях [11]. Однако влияние ГКС, вводимых в таком режиме, одновременно на минеральный обмен, перекисное окисление липидов (ПОЛ) и антиоксидантную систему (АОС) практически не изучено. Кроме того, экспериментальный эквивалент клинической ПТ не разработан. Ранее нами показано, что отечественный монофосфонат димефосфон, оказывает

сходное с бисфосфонатом ксидифоном нормализующее влияние на экскрецию ионов кальция и гидроксипролина с мочой, повышенную преднизолоном при моделировании стероидного остеопороза, при более благоприятном профиле безопасности димефосфона в отношении ПОЛ и АОС [3]. В связи с этим целью нашего исследования — оценить влияние введения преднизолона в режиме ПТ на минеральный обмен, сопряженность ПОЛ и АОС в эксперименте, а также сравнить эффективность димефосфона и ксидифона в профилактике и лечении преднизолон-индуцированных изменений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах обоего пола массой 150 – 200 г, разделенных на 4 группы (одна контрольная и три опытных) по 8 в каждой. Животным первой (контроль) и второй групп ежедневно в течение 10 дней в желудок с помощью зонда вводили физиологический раствор (1мл/100 г массы). Крысам третьей группы вводили димефосфон ежедневно в желудок зондом в дозе 208 мг/кг массы тела [3], а животным четвертой группы в том же режиме вводили ксидифон в дозе 45 мг/кг [1]. С 11-го дня крысам второй, третьей и четвертой групп в течение 3 дней вводили преднизолон ежедневно внутривнутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг массы тела животного, а крысам первой группы — в том же режиме физиологический раствор. На 14-й день эксперимента крыс декапировали под легким эфирным наркозом. Показатели костного метаболизма оценивали по экскреции оксипролина с мочой [7] и активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови [5]. Показатели кальций-фосфорного обмена оценивали по содержанию общего кальция [14], неорганического фосфата (НФ) в сыворот-

¹ Центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — Н. М. Насыбуллина) и кафедра фармакологии (зав. — проф. Р. С. Гараев) Казанского государственного медицинского университета, Казань, 420012, ул. Бутлерова, 49. Кафедра клинической фармакологии и фармакотерапии (зав. — проф. Л. Е. Зиганшина) Казанской государственной медицинской академии, Казань, 4200012, ул. Муштаря, 11.

ке крови [13] и экскреции кальция и НФ с мочой. Уровень общего белка в сыворотке крови определяли рефрактометрически. Активность каталазы и пероксидазы оценивали в эритроцитах крови, содержание церулоплазмينا, общую антиоксидантную активность (АОА), уровень диеновых конъюгатов ненасыщенных высших жирных кислот (ДК) и продуктов ПОЛ, которые реагируют с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-взаимодействующих продуктов), в сыворотке крови [2]. Результаты экспериментов обработаны статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После 10-дневного введения физиологического раствора, димефосфона или ксидифона поведение и внешний вид опытных крыс не отличались от интактных животных - они были подвижными, хорошо ели, прибавляли в весе, шерсть оставалась гладкой и шелковистой. После каждого введения преднизолона у крыс появлялось состояние оглушенности, одышка. Они были вялыми, малоподвижными, сбивались в кучу, прекращали есть и пить, но через 2–3 ч поведение животных становилось прежним. По окончании трехдневного введения преднизолона в режиме ПТ животные опытных групп потеряли набранную за предыдущие 10 дней прибавку в весе — показатели массы тела их были аналогичны исходным во всех трех группах.

Преднизолон, введенный в режиме ПТ, увеличивал более чем в два раза содержание оксипролина в моче животных по сравнению с показателями контрольного уровня. Профилактическое введение димефосфона предупреждало эти изменения, тогда как при применении ксидифона повышенный уровень оксипролина в моче сохранялся. Аналогичные изменения происходи-

ли с уровнем НФ в моче крыс — в группах с профилактическим введением физиологического раствора и ксидифона он был повышенным, тогда как в третьей группе (димефосфонной) его значение не отличалось достоверно от уровня контроля (табл. 1). Повышенный уровень НФ был и в сыворотке крови крыс группы с физиологическим раствором, однако профилактическое применение димефосфона и ксидифона предупреждало это повышение. У крыс трех опытных групп содержание кальция в сыворотке крови и моче не отличались достоверно от соответствующих показателей контрольных животных, в то же время во всех трех группах происходило повышение уровня общего белка в сыворотке крови по сравнению с показателями контрольной группы крыс. В группе с ксимедоном, кроме того, повышалась активность ЩФ в сыворотке крови, тогда как в двух остальных опытных группах таких изменений не происходило.

Преднизолон, введенный в режиме ПТ, приводил к повышению более чем в два раза содержания ДК и почти в два раза — содержания ТБК-взаимодействующих продуктов ПОЛ в сыворотке крови по сравнению с контролем. Профилактическое применение обоих фосфонатов предупреждало эти изменения (табл. 2).

Во всех опытных группах происходило повышение АОА, снижение уровня церулоплазмينا в сыворотке крови, а активность пероксидазы не изменялась достоверно по сравнению с соответствующими контрольными показателями. Однако применение димефосфона и ксидифона позволяло предупредить снижение активности каталазы в сыворотке крови, которое происходило под действием ПТ преднизолоном (см. табл. 2).

Метаболизм костной ткани характеризуется двумя разнонаправленными процессами: образованием но-

Таблица 1. Биохимические показатели в моче и сыворотке крови крыс после 10-дневного введения физиологического раствора, димефосфона (208 мг/кг внутрь) или ксидифона (45 мг/кг внутрь) и последующего 3-дневного курса преднизолона (100 мг/кг внутривенно), $M \pm m$, $n = 8$

Группа	Показатели						
	в моче			в сыворотке крови			
	Оксипролин, мкг/мл	Са, ммоль/л	НФ, ммоль/л	Са, ммоль/л	НФ, ммоль/л	ЩФ, мкат/л	Общий белок, г %
Контроль	5 ± 0,3	0,12 ± 0,02	27,3 ± 5,3	1,8 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,5 ± 0,1	6 ± 0,7
Физиологический раствор + преднизолон, % к контролю	11,1 ± 2,5* 222	0,12 ± 0,01 100	38,6 ± 1,9* 141	1,7 ± 0,5 94	3,3 ± 0,2* 122	3,2 ± 0,3 128	7,9 ± 0,2* 132
Димефосфон + преднизолон, % к контролю	9,2 ± 2,1 184	0,14 ± 0,01 117	35,2 ± 3 129	2 ± 0,3 111	3,1 ± 0,2 115	2,5 ± 0,3 100	7,8 ± 0,2* 130
Ксидифон + преднизолон, % к контролю	12,2 ± 2,7* 244	0,14 ± 0,03 117	43,5 ± 3,1* 159	1,9 ± 0,2 106	2,8 ± 0,3 104	4,1 ± 0,6* 164	8,0 ± 0,3* 133

Примечание. Са — общий кальций, НФ — неорганический фосфат, ЩФ — щелочная фосфатаза. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

вой костной ткани остеобластами и разрушением (резорбцией) старой кости остеокластами. Скорость образования или разрушения матрикса костной ткани оценивается при измерении активности специфических ферментов костеобразования и костеразрушающих клеток, либо путем определения компонентов, поступающих в кровоток во время синтеза или резорбции [8]. Мы установили, что введение преднизолона в режиме ПТ повышало экскрецию оксипролина с мочой. Уровень общего оксипролина в моче отражает интенсивность распада коллагена. Поскольку большая часть коллагена в организме млекопитающих содержится в костях, где уровень его обмена выше, чем в других тканях, можно сделать вывод, что экскреция оксипролина с мочой достоверно отражает костную резорбцию [8]. Краткосрочное введение преднизолона в режиме ПТ не приводило к изменению содержания кальция в крови и моче. Одним из доступных и информативных показателей остеобластической активности считается активность ЩФ. Результаты экспериментов показали, что при введении преднизолона активность ЩФ сыворотки крови не изменялась. Однако преднизолон в режиме ПТ повышал экскрецию НФ с мочой и содержание его в крови.

Таким образом, особенностью влияния ПТ преднизолоном на костный метаболизм по сравнению с моделью остеопороза [3] является более выраженное воздействие на органический компонент кости (оксипролин) и мобилизация НФ. Эксперименты позволили установить сходство и различия в эффективности димефосфона и ксидифона. При сравнении профилактического эффекта фосфонатов на характер нарушений, вызываемых проведением ПТ преднизолоном, выявилось более благоприятное действие димефосфона по сравнению с ксидифоном. Ксидифон не предотвращал индуцированного ПТ преднизолоном повышения эк-

скреции оксипролина с мочой, в то время как для димефосфона это характерный эффект, выявленный нами в ранее проведенных исследованиях [3]. Оба фосфоната не влияли на показатели содержания кальция в сыворотке крови и выведение его с мочой. Однако ксидифон повышал активность ЩФ, являющейся маркером костеобразования, что может свидетельствовать о стимуляции минерального обмена [9].

Преднизолон, введенный в режиме ПТ, повышал АОА сыворотки крови, увеличивая при этом содержание ДК и ТБК-взаимодействующих продуктов ПОЛ. Вероятно, суммарная АОА повышается за счет резервов глутатионового буфера и/или активности супероксиддисмутазы. При этом снижалась активность антиоксидантного фермента каталазы крови и содержание церулоплазмينا. Церулоплазмин — сывороточный антиоксидант, который представляет соединение меди с α -глобулинами и обладает выраженной способностью ингибировать перекисное окисление липидов связыванием свободных супероксидных радикалов [12]. ПТ преднизолоном вызывает определенные сдвиги, происходящие и при моделировании стероидного остеопороза [3]. Общими характерными изменениями являются повышение уровня ДК и снижение активности каталазы крови. Интересной находкой настоящего исследования является повышение суммарной антиоксидантной активности сыворотки в результате ПТ преднизолоном при снижении изученных антиоксидантных факторов — активности каталазы, содержания церулоплазмينا и отсутствии изменений активности пероксидазы. Оба фосфоната увеличивали антиоксидантную активность сыворотки. Димефосфон — сильнее — выше контрольного уровня; ксидифон лишь нормализовал до контроля АОА и активность каталазы крови. Димефосфон и ксидифон примерно в равной степени предупреждали увеличение уровня

Таблица 2. Содержание продуктов ПОЛ и состояние антиоксидантной системы в сыворотке крови крыс после 10-дневного введения физиологического раствора, димефосфона (208 мг/кг внутрь), ксидифона (45 мг/кг внутрь) и последующего 3-дневного курса преднизолона (100 мг/кг внутривенно), $M \pm m$, $n = 8$

Группа	Показатели					
	ДК, мкмоль/л	ТБК-ВП, мкмоль/л	АОА, %	Каталаза, мкатал/л $\times 100$	ПО, мкмоль/мин/л	ЦП, мг%
Контроль	6,3 \pm 0,3	2,5 \pm 0,26	36,36 \pm 2,85	9,3 \pm 0,03	198,7 \pm 4,8	66,9 \pm 3,4
Физиологический раствор + преднизолон, % к контролю	13,9 \pm 1,1*	4,7 \pm 0,4*	50,87 \pm 3,68*	8,8 \pm 0,17*	198,5 \pm 5,6	54,2 \pm 2,8*
Димефосфон + преднизолон, % к контролю	221	188	140	94	100	80
Димефосфон + преднизолон, % к контролю	11,0 \pm 0,8	3,2 \pm 0,2	68,02 \pm 1,63*	9,9 \pm 0,03*	199,06 \pm 5,0	56,12 \pm 1,37*
Ксидифон + преднизолон, % к контролю	175	128	187	107	100	84
Ксидифон + преднизолон, % к контролю	7,7 \pm 0,6	3,5 \pm 0,16	61,92 \pm 4,24*	9,5 \pm 0,16	206,1 \pm 6,0	54,03 \pm 0,66*
	122	140	171	102	103	81

Примечание. ДК — диеновые коньюгаты, ТБК-ВП — ТБК-взаимодействующие продукты ПОЛ, АОА — антиоксидантная активность сыворотки крови, ПО — пероксидаза, ЦП — церулоплазмин. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

диеновых конъюгатов и ТБК- взаимодействующих продуктов ПОЛ в сыворотке крови, вызываемых введением преднизолона в режиме ПТ.

ВЫВОДЫ

1. Преднизолон, введенный в режиме “пульс-терапии”, усиливает экскрецию оксипролина и неорганического фосфата с мочой, повышает содержание неорганического фосфата, общего белка, диеновых конъюгатов и ТБК-взаимодействующих продуктов ПОЛ в сыворотке крови, увеличивая ее антиоксидантную активность (АОА), при снижении содержания церулоплазмينا и активности каталазы крови крыс.

2. Профилактическое введение димефосфона снижает повышенные преднизолоном экскрецию оксипролина с мочой, содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови при стимуляции активности каталазы и общей АОА сыворотки.

3. Профилактическое введение ксидифона не влияет на повышенное преднизолоном выведение оксипролина, повышает активность щелочной фосфатазы сыворотки крови, снижает содержание продуктов ПОЛ, нормализуя сниженную преднизолоном активность каталазы крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Алексеева, Э. А. Юрьева, Е. К. Баландин и др., *Актуальные вопросы фармакотерапии в педиатрии*, Москва (1982).
2. И. Х. Валеева, Л. Е. Зиганшина, *Биохимические методы исследования общих механизмов повреждения и воздействия ксенобиотиков*, Казань (1998).
3. Л. Е. Зиганшина, З. А. Бурнашова, И. Х. Валеева и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, № 6, 39 – 42 (2000).
4. А. В. Истомин, А. А. Каракин, О. А. Хрусталева, *Клин. фармакол. тер.*, № 1, 64 – 66 (2000).
5. В. В. Меньшиков, *Микрометоды биохимического и иммуноферментного анализа*, Москва (1994).
6. Е. Л. Насонов, Н. В. Чичасова, В. Ю. Ковалев, *Глюкокортикоستيероиды в ревматологии*, Москва (1998).
7. Л. Я. Прошина, М. И. Приваленко, *Вопр. мед. хим.*, № 1, 115 – 119 (1982).
8. Б. Л. Риггз, Л. Д. Мелтон, *Остеопороз (этиология, диагностика, лечение)*, Санкт-Петербург (2000).
9. Л. Я. Рожинская, Л. К. Дзеранова, Е. И. Марова и др., *Остеопороз и остеопатии*, № 2, 28 – 32 (1998).
10. А. В. Сумароков, *Нижегород. мед. ж.*, № 4, 80 – 83 (1993).
11. А. Р. Татарский, Т. А. Чеглакова, Е. В. Бобков, *Тер. арх.*, 67(6), 30 – 32 (1995).
12. П. П. Чайло, А. В. Соловьев, Я. М. Ена и др., *Врач. дело*, № 3, 15 – 17 (1992).
13. E. M. Gindler and D. A. Heth, *Clin Chim.*, 17, 662 – 665 (1971).
14. N. W. Tietz, *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Philadelphia (1976).

Поступила 16.04.02

DIMEPHOSPHON AND XYDIPHONE INFLUENCE THE MINERAL METABOLISM AND LIPID PEROXIDATION IN RATS UPON PROLONGED CHRONIC ADMINISTRATION OF PREDNISOLONE

I. Kh. Valeeva, L. E. Ziganshina, Z. A. Burnashova, and A. U. Ziganshin

Kazan State Medical University, Butlerova Str., 49, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia,

The parameters of mineral metabolism, a lipid peroxidation (LPO) process, and the efficacy of antioxidant enzyme preparations were studied in rats with an osteoporosis model induced by the administration of prednisolone in a daily dose of 100 mg/kg (i.p.) over 3 days, which is analogous to a pulsed therapy schedule in clinics. The treatment with glucocorticosteroid enhanced the excretion of hydroxyproline and inorganic phosphates with urine, increased the LPO rate and antioxidant activity of the blood serum, and decreases the level of ceruloplasmin and the catalase activity in the blood. A prophylactic treatment with dimephosphon (208 mg/kg, p.o.) and xydiphone (45 mg/kg, p.o.) prevents from the prednisolone-induced LPO activation. Dimephosphon, in contrast to xydiphone, also prevents from a prednisolone-induced increase in the excretion of hydroxyproline and inorganic phosphates with urine.