

ИЗУЧЕНИЕ ФЛОГОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ МАЗЕЙ N-ГЕКСАДЕЦИЛТРИФЕНИЛФОСФОНИЯ БРОМИДА

Конг Х.Х.¹, Зиганшина Л.Е.¹, Галкина И.В.¹, Орлова О.В.², Егорова С.Н.²

¹ ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия (420008, Казань, ул. Кремлевская, 18), e-mail: conghonghanh@yahoo.com

² ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия (420012, Казань, ул. Бутлерова, 49)

Четвертичная соль фосфония – *n*-гексадецилтрифенилфосфония бромид – обладает антибактериальным и противогрибковым свойствами в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Candida Albicans*. Установлено, что мази *n*-гексадецилтрифенилфосфония бромид на основе вазелина эффективны в лечении мастита (воспаления молочной железы) у коров при применении в течение 5 дней. С целью изучения флоготропных свойств (про- или противовоспалительных) мазей *n*-гексадецилтрифенилфосфония бромид в разных концентрациях провели эксперимент на крысах по моделированию воспалительного отека лап каррагенином. Животным наружно накладывали мази на область стоп в течение 13 дней. Для максимально точной оценки интенсивности моделированной каррагенином воспалительной реакции и потенциального флоготропного действия разрабатываемых мазей рассчитывали площадь под кривой «Прирост объема лап – время». Результаты нашего исследования показали отсутствие флоготропных свойств этих мазей в концентрациях 0,05 и 0,25% — про- или противовоспалительных.

Ключевые слова: противовоспалительная активность, воспаление, бактерицидная активность, антимикотическая активность, мази, каррагениновый отек лап крыс

EVALUATION OF PHLOGOTROPIC EFFECTS OF N-HEXADECYLTRIPHENYLPHOSPHONIUM BROMIDE APPLIED LOCALLY AS AN OINTMENT

Cong H.H.¹, Zyganshina L.E.¹, Galkina I.V.¹, Orlova O.V.², Egorova C.N.²

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia (420008, Kazan, street Kremlevskaya, 18), e-mail: conghonghanh@yahoo.com

² Kazan State University of Medicine, Kazan, Russia (420012, Kazan, street Butlerova, 49)

The quaternary salt of phosphonium – N-hexadecyltriphenylphosphonium bromide has antibacterial and antifungal properties against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Candida Albicans*. It was found that N-hexadecyltriphenylphosphonium bromide was effective in treatment of cows' mastitis when applied locally in ointment. To study anti-inflammatory effects of these ointments at varying concentrations we carried out an experiment on the model of carrageenan-induced rat paw edema. N-hexadecyltriphenylphosphonium bromide in ointments was applied topically for 13 days on inflamed rat paws. To get the most accurate estimate of the intensity of the carrageenan-induced inflammation we calculated area under the curve «Increase in paw volume – time». Ointments of N-hexadecyltriphenylphosphonium bromide (0,05% and 0,25%) were shown to be neutral – devoid of phlogotropic properties, either pro- or anti-inflammatory.

Keywords: antibacterial property, antifungal property, anti-inflammatory activity, inflammation, carrageenan-induced rat paw edema, ointment

Четвертичная соль фосфония — *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромид $[(C_6H_5)_3P^+C_{16}H_{33}]Br$ — относится к III классу токсичности («умеренно опасные» вещества) и обладает высокой бактерицидной и антимикотической активностью в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Candida Albicans* [1], что обуславливает перспективность применения данного биологически активного соединения как антисептического средства для местного применения.

Установлена эффективность 0,05%-ной мази *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида на основе вазелина для лечения мастита (воспаления молочной железы) у коров, обеспечивающая выздоровление в течение 5 дней применения, что сопоставимо с интрацистернальным (внутривымянным) введением антисептических средств [7].

Цель исследования

Целью работы явилось изучение потенциальной флоготропной (про- или противовоспалительной) активности *n*-гексадецилтрифенилфосфония бромида при наружном применении в форме мази.

Материалы и методы

Технология получения мазей *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида. Мази *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида изготавливали на основе вазелина в концентрациях 0,05% и 0,25% — перемешиванием биологически активного соединения (без предварительного измельчения) с основой при температуре 40 °С. *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромид растворяется в основе, образуя однородную мазь-раствор.

Исследование противовоспалительной активности. Эксперименты были проведены на 24 лабораторных беспородных крысах (самцах) массой 320±33 г. Подопытных животных содержали в условиях вивария (с естественным режимом освещения; при температуре 22–24°C; относительной влажности воздуха 40–50%) с использованием стандартной диеты (ГОСТ Р 50258-92) [3]. Исследования проводили в соответствии с правилами качественной лабораторной практики (GLP) при проведении доклинических исследований в РФ, а также правилами и Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1986) [4].

Каррагениновый отек лап крыс вызывали субплантарным введением (под подошвенный апоневроз) в заднюю правую лапу крыс 0,1 мл 1%-ного водного геля каррагинина [6], который готовили перед введением. Выраженность отека оценивали путем измерения объема лапы животных с помощью плетизмометра 37140 (Ugo Basile, Италия). Измерения производили до индукции отека (исходный объем), через 1, 2, 3, 4 и 24 ч после подподошвенного введения каррагинина, а далее 1 раз в день в течение 13 дней. Лапу животных погружали в камеру плетизмометра до тиббиотарзального сустава.

О противовоспалительной активности исследуемых соединений судили по уменьшению прироста объема лапы, выраженного в процентах к исходному объему по сравнению с группой контроля.

Объем лапы животного до введения каррагинина считали исходным и принимали за 100%.

% прироста объема лапы = [(объем после введения каррагинина в соответствующий момент времени – исходный объем) / исходный объем] *100.

Подопытные животные были разделены на 4 группы по 6 крыс, которым наносили мази на лапу 1 раз в сутки в течение 13 дней:

группа 1: контроль – вазелин;

группа 2: препарат сравнения — Тридерм® (Шеринг-Плау лабо Н.В., мазь) для наружного применения, содержащая в 1 г: бетаметазон 0,5 мг (в виде бетаметазона дипропионата 0,64 мг), клотримазол 10 мг, гентамицин 1 мг (1000 МЕ) [5];

группа 3: 0,05%-ная мазь *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида;

группа 4: 0,25%-ная мазь *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2010 с вычислением средней арифметической *M*, ее стандартного отклонения δ и стандартной ошибки *m*. Для оценки достоверности различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический *t*-критерий Стьюдента. За достоверное принимали различие при уровне вероятности 95 % и более ($p \leq 0,05$).

Для максимально точной оценки интенсивности моделированной каррагином воспалительной реакции и потенциального флоготропного действия разрабатываемых мазей рассчитывали площадь под кривой «Прирост объема лап – время» следующим образом. Вычисляли площадь под кривой с помощью стандартного метода численного интегрирования – метода трапеций, где площадь криволинейной трапеции заменяется площадью многоугольника, составленного из *N* трапеций, при этом кривая заменяется вписанной в нее ломаной. На каждом из частичных отрезков функция аппроксимируется прямой, проходящей через конечные значения, при этом площадь трапеции на каждом

отрезке определяется по формуле :
$$s_i = \frac{f(t_i) + f(t_{i-1})}{2} \cdot (t_i - t_{i-1})$$

Высота трапеций составляет небольшую величину, соответствующую отрезку $\Delta t = t_i - t_{i-1}$ При этом площадь под графиком функции можно вычислить как сумму площадей составляющих прямоугольных трапеций.

$$S = \sum_{i=a}^b s_i = \sum_{i=a}^b \frac{f(t_i) + f(t_{i-1})}{2} \cdot (t_i - t_{i-1})$$

Результаты и обсуждение

Каррагининовый отек лап крыс

Воспалительная реакция, вызванная субплантарным введением 1%-ного геля каррагинина, развивалась в виде отека с увеличением объема лап крыс на 16–24 % от исходного объема. Максимальное развитие отека наблюдалось у животных контрольной группы через 3 ч после введения каррагинина, что соответствует литературным данным о развитии каррагининового отека лап крыс [8, 9]. Тридерм проявил противовоспалительную активность на сроке 3 и 4 ч после введения каррагинина с подавлением отека на 62 % ($p = 0,02$). На сроке 4 ч после индукции отека наружное введение мази тридерма способствовало подавлению отека лап крыс на 57 % ($p = 0,02$). На 3-е, 4-е, 5-е, 6-е и 7-е сутки (через 48, 72, 96, 120 и 144 ч после введения каррагинина) противовоспалительное действие тридерма проявилось в виде подавления отека лап крыс на 79, 80, 79, 85 и 95% ($p = 0,002; 0,01; 0,01; 0,02$ и $0,05$) соответственно. На 7-й день эксперимента отек лап крыс под действием тридерма полностью исчезал.

Мази *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида в концентрации 0,05% и 0,25% не проявили противовоспалительную активность в условиях эксперимента (таблица 1).

Таблица 1

Процент прироста объемов лап крыс на различных сроках после моделирования острого каррагининового отека на фоне лечения мазью Тридерм, 0,05%-ной и 0,25%-ной мазями *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида $M \pm m$ (δ), Т-тест

Группы Сроки	Группа-1 Контроль	Группа-2 Тридерм		Группа-3 Мазь 0,05%		Группа-4 Мазь 0,25%	
		$M \pm m$ (δ)	Ттест	$M \pm m$ (δ)	Ттест	$M \pm m$ (δ)	Ттест
1 ч	16,3±3,5 (8,6)	9,2±2,3 (5,8)	0,07	12,5±3,7 (9,7)	0,24	9,0±3,0 (6,7)	0,07
2 ч	21,3±5,2 (12,7)	14,0±3,2 (7,8)	0,14	16,0±5,0 (13,4)	0,25	16,9±3,2 (7,1)	0,24
3 ч	24,2±5,1 (12,4)	9,0±2,5 (6,1)	0,02	23,1±6,0 (15,9)	0,45	27,8±1,9 (4,3)	0,26
4 ч	22,6±4,9 (12,1)	9,7±3,2 (7,8)	0,03	25,5±6,0 (15,8)	0,37	33,1±5,5 (12,4)	0,10
24 ч	19,6±6,3 (15,3)	9,2±1,6 (3,9)	0,08	23,8±4,1 (11,0)	0,30	30,1±1,5 (3,4)	0,08
48 ч	21,2±4,2 (10,2)	4,5±1,9 (4,6)	0,004	26,7±2,6 (6,8)	0,15	24,7±4,6 (10,4)	0,29
72 ч	15,7±3,9	3,1±1,2	0,01	20,8±2,7	0,16	19,4±4,5	0,27

	(9,7)	(3,0)		(7,2)		(10,0)	
96ч	10,4±2,6 (6,4)	2,1±1,4 (3,4)	0,01	15,3±1,3 (3,4)	0,07	12,3±3,3 (7,3)	0,22
120ч	8,0±3,0 (7,5)	0		6,8±2,9 (7,6)	0,39	12,4±1,4 (3,1)	0,15
144ч	4,6±2,2 (5,4)	0		8,4±2,9 (7,8)	0,18	6,7±2,1 (4,7)	0,25
168ч	4,0±1,9 (4,7)	0		4,8±2,4 (6,3)	0,40	2,1±1,9 (4,4)	0,26
192ч	3,1±1,5 (3,7)	0		1,7±0,9 (2,4)	0,23	0,8±0,6 (1,4)	0,10
264ч	0	0		0		0	

— Т-тест по сравнению с контрольной группой (0,05 г вазелин).

Однако при использовании 0,25%-ной мази *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида замечена тенденция к усилению величины воспалительного отека лап крыс, вызванного субплантарным введением 1%-ного водного геля каррагинина (рис. 1).

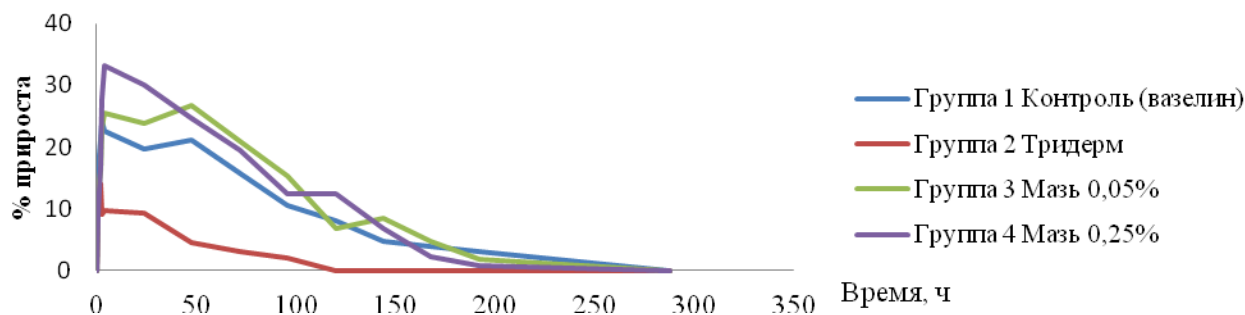


Рис. 1. Процент прироста объема лап крыс, вызванного субплантарным введением каррагинина, на фоне наружного лечебно-профилактического введения мази тридерма, мази *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида 0,05% и мази *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида 0,25%.

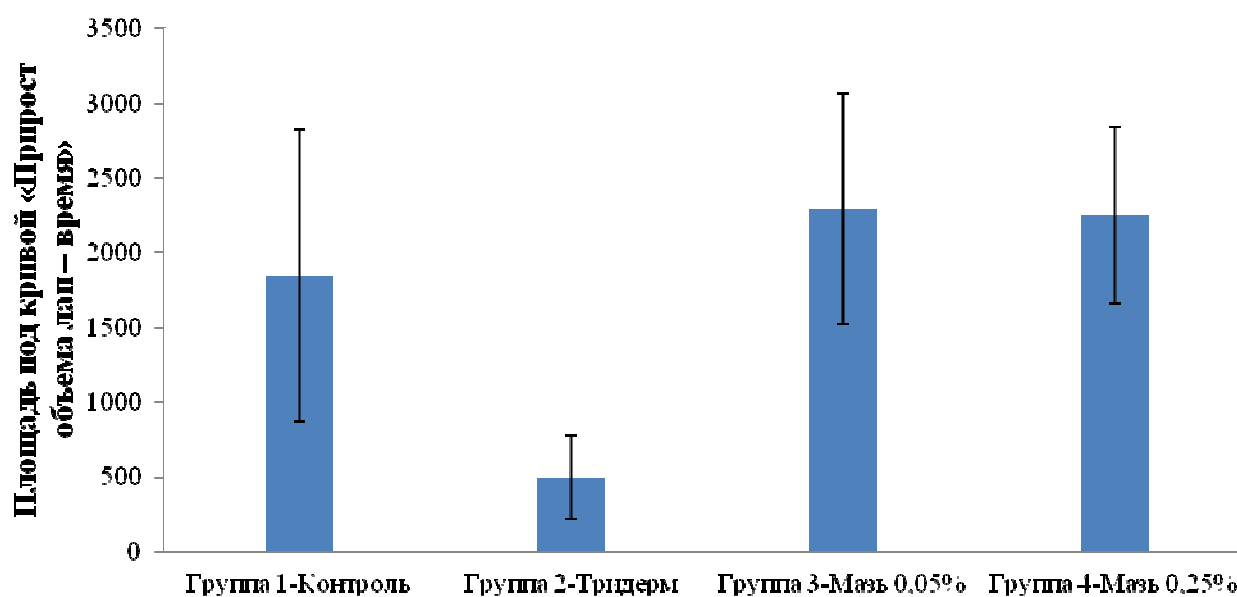
«Провоспалительный» эффект при увеличении концентрации *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида в мази может быть обусловлен тем, что *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромид является амфифильным детергентом, работающим как в водной, так и жировой фазе и вследствие этого — пенетрирующим агентом, проникающим через биомембраны [2], что может способствовать глубокому проникновению каррагинина в ткани и тем самым — усилению воспаления.

При вычислении площади под кривой «Прирост объема лап – время» мы не обнаружили различий в показателях контрольной группы и групп животных, которым использовали мази *n*-гексадецилтрифенилфосфония бромида, что позволяет нам делать заключение об отсутствии местно-раздражающих и истинно провоспалительных свойств у этого соединения (табл. 2 и рис. 2).

Таблица 2

Площади под кривой «Прирост объема лап – время» при моделировании отека у крыс субплантарным введением каррагинина, на фоне наружного лечебного применения мазей *n*-гексадецилтрифенилфосфония бромида и тридерма

№ п/п	Группы	Площади под кривой «Прирост объема лап – время» (M±δ)
1	Контроль	1845,4±973,6
2	Тридерм	494,9 ± 277,1
3	Мазь 0,05%	2293,5 ± 770,7
4	Мазь 0,25%	2250,3 ± 592,0



*Рис. 2. Площади под кривой «Прирост объема лап – время» при моделировании отека у крыс субплантарным введением каррагинина, на фоне наружного лечебного применения мазей *n*-гексадецилтрифенилфосфоний бромида и Тридерм*

Выводы

N-гексадецилтрифенилфосфоний бромид при наружном лечебном применении в течение 13 дней в форме мази (0,05% и 0,25%) на лапы крыс с моделированным каррагининовым отеком не оказывает флоготропного (ни противовоспалительного, ни провоспалительного) действия.

Список литературы

1. Галкина И.В. Синтез, строение и исследование биологической активности солей фосфония // В сб.: Фармакология и токсикология фосфорорганических соединений и других биологически активных веществ. (Выпуск 4: Материалы Российской конференции, посвященной 75-летию профессора И.А. Студенцовой). – Казань, 2008. – С. 23.
2. Галкина И.В. Взаимодействие солей фосфония с липидными компонентами мембран // Фармация. — 2009. — № 4. – С. 35–38.
3. ГОСТ Р 50258-92 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия доступа: http://www.infosait.ru/Pages_gost/28067.htm (дата обращения: 01.11.2013).
4. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) от 18 марта 1986 г. — доступа: <http://docs.pravo.ru/document/view/20823584/19912623> (дата обращения: 01.11.2013).
5. Инструкция по медицинскому применению препарата ТРИДЕРМ®. — доступа <http://grls.rosminzdrav.ru/InstrImg.aspx?idReg=6409&t=&isOld=1> (дата обращения: 01.11.2013).
6. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
7. Патент РФ № 2013112041/15, 10.01.2015.
8. Егорова С.Н., Орлова О.В., Галкина И.В., Тудрий Е.В., Сунагатуллин Ф.А., Сороко В.В. Фармацевтическая композиция Уберит для лечения мастита коров на основе н-тетрадецилтрибутилфосфонийбромида // Патент России № 2538684.2015. Бюл. № 1.
9. Amasceno S. R. B. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice// *Life Sciences*. – 2014. — Vol. 94, № 1. P. 58–66.
10. Su S. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic properties of individual and combined extracts from *Commiphora myrrha*, and *Boswellia carterii*// *Journal of Ethnopharmacology*. – 2012. — Vol. 139, № 2. P. 649–656.

Рецензенты:

Зиганшин А.У., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии фармацевтического факультета КГМУ, г. Казань;
Альберт А.Р., д.б.н., профессор, кафедра генетики, института фундаментальной медицины и биологии, КФУ, г. Казань.

