

© Гриб В.В., Вернигородський С.В., Степанюк Г.І.

УДК: 616.72-002: 615.276

Гриб В.В., Вернигородський С.В., Степанюк Г.І.

Кафедра фармакології, кафедра патологічної анатомії з курсом судової медицини та права Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН СУГЛОБІВ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ НАТРІЄВОЇ СОЛІ 4-(3-МЕТИЛ-2-ОКСО-2Н-[1,2,4]ТРИАЗИНО[2,3-С]ХІАЗОЛІН-6-ІЛ) БУТАНОВОЇ КИСЛОТИ (СПОЛУКИ DSK-38) ТА ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ НА МОДЕЛІ АД'ЮВАНТНОГО АРТРИТУ

Резюме. На моделі ад'ювантного артриту встановлено наявність у натрієвій солі 4-(3-метил-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл) бутанової кислоти (сполуки DSK-38) протизапальних властивостей, які за своєю ефективністю не поступалися диклофенаку натрію. Поряд з антипроліферативними властивостями у сполуки DSK-38 на відміну від диклофенаку натрію спостерігали також і антисклерогенний ефект.

Ключові слова: натрієва сіль 4-(3-метил-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл) бутанової кислоти, патоморфологічні зміни, диклофенак натрію, ад'ювантний артрит.

Вступ

У теперішній час експериментальна модель ад'ювантного артриту (АА), викликаного введенням повного ад'юванта Фрейнда, залишається загальноприйнятою та найзручнішою, так як дозволяє ефективно оцінити протизапальну активність лікарських препаратів та нових сполук щодо таких патологічних станів як: ревматоїдний артрит, артроз та інших хронічних запальних захворювань опорно-рухової системи [Стефанов, 2001; Snehalatha, 2013].

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) відносяться до числа найбільш часто вживаних в даний час лікарських засобів [Зборовская, 2005; Lanza, 2009]. За даними Американської асоціації ревматологів НПЗП приймає більше 5% населення планети [Мишукін і др., 2006; Conaghan, 2012]. Однак, поряд із достатнім

ступенем клінічної ефективності препарати даної групи не завжди задовільняють клініцистів через ряд побічних ефектів, серед яких на першому плані виступають ускладнення з боку шлунково-кишкового тракту [Зборовская, 2005]. У зв'язку з цим актуальним залишається пошук нових молекул з протизапальною дією та мінімальними побічними ефектами.

У цьому плані нашу увагу привернула натрієва сіль 4-(3-метил-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл) бутанової кислоти (сполука DSK-38), комплекс фармакологічних властивостей якої (анальгетична, протигіпоксична, протиішемічна, антиоксидантна) [Семененко, 2014] дає підставу сподіватись на наявність у неї протизапального ефекту. В якості препарату-порівняння обрано диклофенак-натрію - "золотий стандарт"

НПЗП.

Мета роботи: на основі патоморфологічного дослідження дати порівняльну оцінку лікувальної дії сполуки DSK-38 та диклофенаку на моделі експериментального ад'ювантного артриту.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 35 нелінійних щурах-самцях масою 140-205 г, розбитих на 5 груп по 7 особин в кожній: 1 група - інтактні щури; 2- щури з АА без лікування (контрольна патологія, евтаназія на 14 добу); 3- щури з АА без лікування (контрольна патологія, евтаназія на 28 добу); 4- щури з АА, ліковані сполукою DSK-38 (2 мг/кг, в/оч); 5- щури з АА, ліковані диклофенаком (4 мг/кг, в/оч). Дози обох речовин дорівнювали 1/2 їх ЕД₅₀ за попереднім дослідженням [Чорноіван та ін., 2013]. Тварини 2 та 3 груп отримували еквівалентну кількість 0,9% розчину NaCl. АА моделювали шляхом одноразового субплантарного введення в праву задню кінцівку щурів 0,1 мл повного ад'юванта Фрейнда (Thermo scientific, USA). Лікування проводили з 14 по 28 день експерименту. Ступінь лікувальної дії оцінювали на 28 добу експерименту через 5-6 год після останнього введення досліджуваних речовин.

Для оцінки морфологічних змін синовіальної оболонки (СО) суглобів експериментальних тварин з АА гомілковостопні суглоби фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну та піддавали декальцинації. Препарати готували за стандартною методикою, гістологічні зрізи товщиною 5-7 мкм фарбували гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за ван Гізоном, основним коричневим за Шубічем, комбінацією основного коричневого та міцного зеленого барвника, ШИК-реакції з альціановим синім [Автандилов, 2002, 2007].

Мікроскопію і фотографування гістологічних препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа OLIMPUS BX 41 при збільшеннях у 40, 100, 200 і 400 разів. Отримували і обробляли знімки, проводили морфометрію та статистичну обробку за допомогою програми "Quick PHOTO MICRO 2.3". Вміст клітинних елементів визначали з розрахунку на одиницю умовної площі (1мм²). При виконанні морфометричних досліджень керувалися основними засадами, викладеними в керівництві Г.Г.Автандилова [2002].

Результати. Обговорення

При гістологічному аналізі гомілковостопних суглобів контрольних тварин з АА без лікування на 14 добу експерименту в синовіальній оболонці (СО) спостерігали картину хронічного запалення з різним ступенем виразності ексудативної та проліферативної реакції, склерозом та дегенеративними змінами у волокнистій сполучній тканині. Як у поверхневих, так і глибоких зонах потовщеної СО відмічено осередкове розростання грануляційної тканини з великою кількістю судин з вогнищевою, місцями з дифузною інфільтрацією лімфоїд-

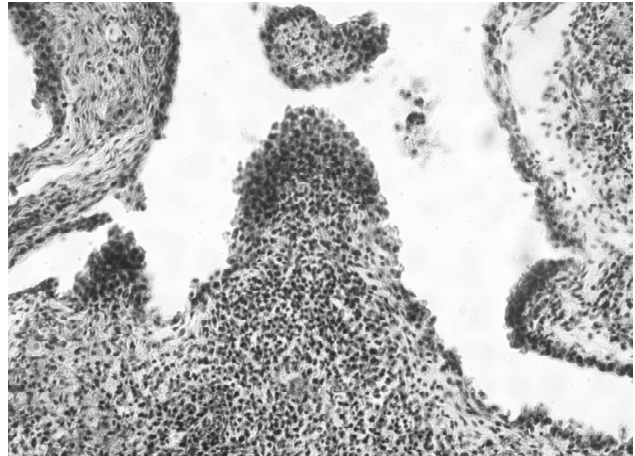


Рис. 1. Проліферація синовіцитів з утворенням сосочків, виражена лімфоцитарна інфільтрація стріми синовіальної ворсини, десквамація ворсин. АА без лікування. 14 добу. Гематоксилін-еозин. x200.

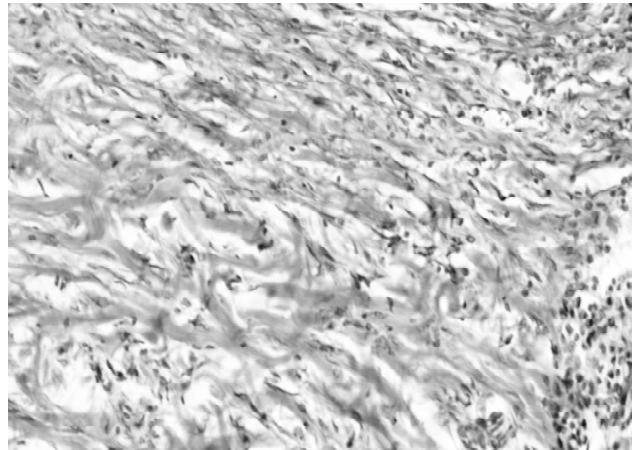


Рис. 2. Розростання сполучнотканинних волокон у стрімі синовіальної ворсини. АА без лікування. 28 добу. Ван-Гізон. x400.

ними, плазматичними клітинами та макрофагами. Проліферація синовіцитів на внутрішній поверхні синовія наростала відповідно наявності клітинного інфільтрату у товщі суглобової сумки з формуванням сосочків із проліферуючих клітин (рис. 1).

Суглобова поверхня кістки мала нерівну вистилку з наявністю дефектів, утворених за рахунок острівків паннуса з деструкцією хряща, які чергувалися з ділянками проліферації хрящової тканини. Структура її, як правило, не визначалася через тотальну інфільтрацію її лімфоцитами, плазмоцитами і клітинами макрофагального ряду. При гістологічному дослідженні гомілковостопних суглобів у всіх тварин з АА виявляли морфологічні ознаки розвитку запальних, гіперпластичних та деструктивно-дистрофічних процесів.

На 28 добу експерименту у тварин контрольної групи в проміжних і глибоких зонах СО зустрічалися широкі поля грануляційної тканини різного ступеня зрілості, вони складалися головним чином з капілярів, фіброblastів, гістіоцитів та лімфоцитів. В центральних відділах

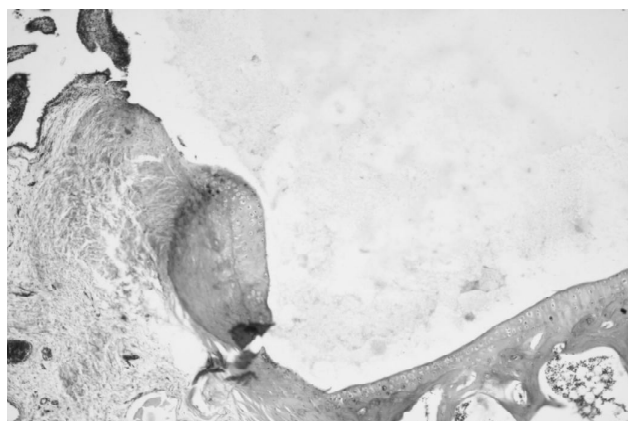


Рис. 3. Розростання грануляційної та фіброзної тканини в поверхневих та проміжних відділах хряща. Диклофенак натрію. 28 доба. Гематоксилін-еозин. $\times 100$.

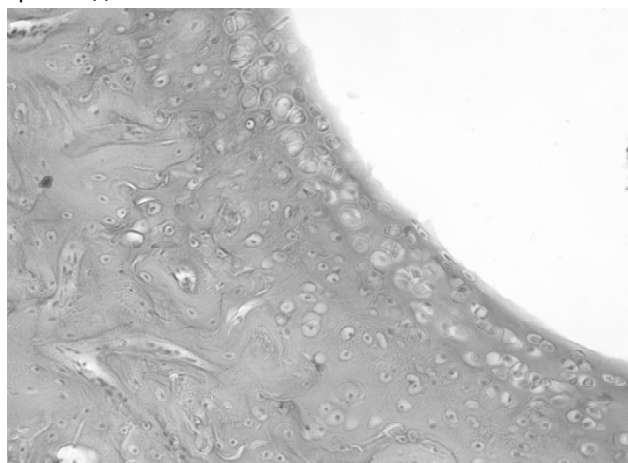


Рис. 4. Поява кислих глікозаміногліканів (синього кольору) в дисоційованих хондроцитах суглобового хряща. DSK-38. 28 доба. Комбінована ШИК-реакція - альціановий синій. $\times 200$. таких інфільтратів відмічали дегенеративні зміни основної речовини, яка була оточена сполучнотканинними волокнами. При забарвленні зрізів за ван-Гізеном склеротично змінені ділянки фарбувалися в червоний колір (рис. 2) та були осередково позитивні при виконанні ШИК-реакції.

На 28 добу експерименту в суглобовому хрящі піддослідних тварин з АА, які отримували окремо диклофенак натрію та сполуку DSK-38, найбільш виражених змін зазнавали поверхневі відділи хряща (поверхнева та проміжна зони), куди вростала грануляційна тканина паннуса та руйнувала суглобовий хрящ (рис. 3).

Але, на відміну від нелікованих тварин, повної інвазії синовія до хрящової тканини не спостерігалось. Застосування сполуки DSK-38 у щурів з АА призводило до зменшення або відсутності запалення як у суглобі, так і в периакулярних тканинах. Шкірний покрив мав звичайну гістологічну структуру у переважної більшості (у

6 із 7) експериментальних тварин. Хрящова поверхня була гладкою, з чітко обумовленими зонами і наявністю незмінених хондроцитів. Прилегла кісткова тканина представлена компактною кісткою з наявністю невеликих грубоволокнистих фрагментів балкової будови. На тлі лікування сполукою DSK-38 деструкція кістки, в результаті запальної реакції, супроводжувалася відновленням кісткової тканини та вогнищевим відновленням функції синовіальної та хрящової тканини, про що свідчило поява кислих глікозаміногліканів в дисоційованих хондроцитах (рис. 4).

Відновлення кісткової тканини реалізувалося шляхом розростання сполучної тканини і трансформації її в хрящ. СО була гіперплазованою з проліферуючими синовіцитами як макрофагального, так і секреторного типів. Тільки в поодиноких випадках зберігалися явища помірного набряку і незначна вогнищева лімфогістіоцитарна інфільтрація. Достовірне зменшення на тлі DSK-38 кількості фібробластів в групі тварин з АА ($1350 \pm 152,93$, $p < 0,05$ у порівнянні з нелікованим та лікованим диклофенаком натрію, відповідно $1930 \pm 198,91$ та $1630 \pm 226,1$), свідчить про властивість даної речовини інгібувати синтез колагену фібробластами грануляційної тканини та пригнічувати проліферативну фазу запалення.

Таким чином, за результатами патоморфологічного дослідження встановлено наявність протизапальних властивостей у сполуки DSK-38, які за своєю ефективністю не поступаються диклофенаку натрію.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Сполука DSK-38 зменшує запальний процес синовіальної оболонки гомілковостопних суглобів і по ефективності не поступається препарату порівняння диклофенаку натрію, про що свідчить наявність у даної сполуки антипроліферативних властивостей.

2. Поряд з антипроліферативними властивостями на відміну від диклофенаку натрію у новій сполуки DSK-38 спостерігали також і антисклерогенний ефект, про що свідчила низька ступінь фібробластичної реакції ($1350 \pm 152,93$, $p < 0,05$).

Результати проведеного дослідження обґрунтовують можливість профілактики й терапії хронічного запалення шляхом застосування натрієвої солі 4-(3-метил-2-оксо-2H-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл) бутанової кислоти (сполуки DSK-38), що дозволить у подальшому досягти санації та зниження активності запального процесу та обумовлюють перспективи подальшого вивчення її фармакологічних властивостей та безпечності, зокрема щодо ШКТ, печінки та нирок, на предмет придатності для створення на її основі нового НПЗП.

Список літератури

- | | |
|---|---|
| Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г.Автандилов.- М.: Медицина, 2002.- 240с. | Автандилов Г.Г. Основы патологоанатомической практики. Рук-во (изд. 3 дополненное) / Г.Г.Автандилов.- М.: Российская мед. академия последипломного образования.- 2007.- 480с. |
|---|---|

- Зборовская И.А. Гастропатии, индуцированные нестероидными противовоспалительными препаратами. Метод. пособие /И.А.Зборовская.- Волгоград. 2005.- 16с.
- Минушкин О.Н. Профилактика НПВС-гастропатий у больных с факторами риска желудочно-кишечных повреждений /О.Н.Минушкин, Л.В.Масловский, В.М.Леонов //Лечащий врач.- 2006.- №2.- С.92-94.
- Семененко Н.О. Церебропротекторні властивості похідних (3-*R*-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-*c*]хіназолін-6-іл) карбонових кислот: Автореф. дис. ... канд. мед. н.- Одеса, 2014.- 20с.
- Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. реком. / О.В.Стефанов.- К.: Авіцена, 2001.- 528с.
- Порівняльна оцінка анальгетичного ефекту похідного хіназоліну (сполука DSK-38) та диклофенаку на моделі вісцерального болю /Н.Г.Чорноіван, В.В.Гриб, О.М.Дорошенко [та ін.] //Клінічна фармація: 20 років в Україні: Матер. нац. конгресу.- Харків, 2013.- С.236-237.
- Conaghan P.G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity / P.G.Conaghan //Rheumatol. Int.- 2012.- Vol.32, №6.- P.1491-1502.
- Snehalatha U. Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model /U.Snehalatha // Zeitschrift fur Rheumatologie.- 2013.- Vol.72, Issue 4.- P.375-382.
- Lanza F.L. Prevention of NSAID-Related Ulcer Complications /F.L.Lanza //Am. J. Gastroenterol.- 2009.- Vol.104.- P.728-738.

Гриб В.В., Вернигородский С.В., Степанюк Г.И.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СУСТАВОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НАТРИЕВОЙ СОЛИ 4-(3-МЕТИЛ-2-ОКСО-2Н-[1,2,4]ТРИАЗИНО[2,3-С]ХИНАЗОЛИН-6-ИЛ) БУТАНОВОЙ КИСЛОТЫ (СОЕДИНЕНИЯ DSK-38) И ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ НА МОДЕЛИ АДЪЮВАНТНОГО АРТРИТА

Резюме. На модели адъювантного артрита установлено наличие у натриевой соли 4-(3-метил-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-*c*]хиназолин-бил) бутановой кислоты (соединения DSK-38) противовоспалительных свойств, которые по своей эффективности не уступали диклофенаку натрия. Вместе с антипролиферативными свойствами, в отличие от диклофенака натрия, у соединения DSK-38, наблюдали также противосклеротический эффект.

Ключевые слова: патоморфологические изменения, диклофенак натрия, натриева соль 4-(3-метил-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-*c*]хиназолин-бил) бутановой кислоты, адъювантный артрит.

Grib V.V., Vernigorodskiy S.V., Stepanyuk G.I.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE JOINTS WHEN USING THE SODIUM SALT OF 4- (3-METHYL-2-OXO-2H- [1,2,4] TRIAZINO [2,3-C] QUINAZOLIN -6-YL) BUTYRIC ACID (COMPOUND DSK-38) AND DICLOFENAC ON ADJUVANT ARTHRITIS MODEL

Summary. On the model of adjuvant arthritis found the presence of the sodium salt 4- (3-methyl-2-oxo-2H- [1,2,4] triazino [2,3-c] quinazolin -6-yl) butyric acid (compound DSK-38) anti-inflammatory properties, which by their effectiveness is not received diclofenac sodium. Together with antiproliferative properties, unlike diclofenac sodium in the compound DSK-38 anti-sclerotic effect was also observed.

Key words: pathological changes, sodium salt of 4- (3-methyl-2-oxo-2H- [1,2,4] triazino [2,3-c] quinazolin -6-yl) butyric acid, diclofenac sodium, adjuvant arthritis.

Рецензент - д.біол.н., проф. Пісун Р.П.

Стаття надійшла до редакції 21.04.2015 р.

Гриб Вікторія Володимирівна - лікар-стоматолог Вороновицького психо-неврологічного інтернату Вінницької області, +38 093 065-08-06; pharmacology@vnmu.edu.ua

Вернигородський Сергій Вікторович - д.мед.н., професор кафедри патологічної анатомії з курсом судової медицини та права Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова; +38 0432 53-37-31

Степанюк Георгій Іванович - д.мед.н., професор кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова; +38 0432 61-14-00; pharmacology@vnmu.edu.ua