

© Литвинова О. Н.

УДК 615. 01. 547:615. 461. 2

Литвинова О. Н.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АСПЕКТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ОКСАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Изучены некоторые стороны механизма противовоспалительного действия нового производного оксаминового кислоты – метоксарада на течение хронического воспалительного процесса, близкого по патогенезу и морфофункциональным изменениям к коллагенозам человека. Установлено, что метоксарад обладает достаточным терапевтическим действием при хроническом воспалительном процессе у экспериментальных животных. Введение метоксарада купировало процесс воспаления в суставах у лабораторных животных, нормализовало показатели крови, предотвращало развитие системного поражения суставов, снижало процент деструктивных изменений в суставах, предупреждало развитие грубых изменений стромы миокарда, активировало процессы репаративной регенерации первоначально поврежденных экспериментальной адьювантной болезнью ультраструктур мышечных клеток сердца. Целесообразно дальнейшее изучение метоксарада с целью создания нового лекарственного средства с противовоспалительными и антиэкссудативными свойствами.

Ключевые слова: воспаление, модель адьювантной болезни, производные оксаминового кислоты, противовоспалительное действие.

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

Введение. Воспаление – одна из важнейших проблем общей патофизиологии и внутренней медицины. Это типовой патологический процесс, направленный на уничтожение, инактивацию или ликвидацию повреждающего агента и восстановление поврежденной ткани. Такая сложная реакция организма на повреждение лежит в основе формирования многих заболеваний, встречающихся в практической медицине [5].

Фармакологическая регуляция воспалительного процесса относится к числу наиболее важных и сложных проблем современной фармакологии [2].

В настоящее время в клинической практике применяется большое количество лекарственных средств для лечения воспалительного процесса. Ведущим классом медикаментозных средств, которые используются при лечении воспалительных

заболеваний, являются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС). НПВС по механизму противовоспалительного действия поливалентны и почти универсально активны при различных по этиологии, морфологии и патофизиологии воспалительных процессах [6]. Это одни из наиболее применяемых препаратов в мире, их используют около 20% населения земного шара. Сегодня на фармацевтическом рынке Украины представлены десятки наименований нестероидных противовоспалительных средств [4].

При хроническом воспалительном синдроме терапия должна быть длительной, поэтому основным требованием к ней является безопасность лечения [9]. Широкий спектр влияния на ферментативную деятельность организма обуславливает развитие многих нежелательных побочных эффектов [10, 11].

В связи с этим целесообразно продолжать поиски новых отечественных высокоэффективных и малотоксичных лекарственных веществ, обладающих противовоспалительной активностью.

Из различных классов химических веществ в качестве источника потенциальных лекарств широкую известность приобрели дикарбоновые кислоты. Анализ результатов компьютерного прогноза и доступной литературы показал, что изучаемые нами производные дикарбоновых кислот обладают противовоспалительными свойствами [1, 7].

В результате изучения противовоспалительной активности 115 новых производных дикарбоновых кислот мы отобрали для доклинического изучения 4-метил-аренсульфамида-1-адамантилоксаминового кислоты – метоксарад.

Целью исследования являлось выявление сторон механизма противовоспалительного действия метоксарада, изучение его влияния на течение хронического воспалительного процесса, близкого по патогенезу и морфофункциональным изменениям к коллагенозам человека.

Материалы и методы. Специфическую активность метоксарада изучали согласно Методическим рекомендациям по экспериментальному (доклиническому) исследованию нестероидных противовоспалительных средств [3, 8]. Метоксарад представляет собой белый порошок с температурой плавления 203-205°C, растворим в ДМФА, труднорастворим в воде. Данное соединение синтезировано на кафедре

Таблиця 1

**Антиэкссудативная активность метоксаарада и вольтарена
на модели адьювантного артрита у белых крыс линии Вистар (M±m)**

Серия опытов	Исходный объем лапки	Прирост объема лапки, мл и % через ... сутки				
		5	10	15	20	28
Контроль	1,95±0,18 100%	0,71±0,15 35,9%	0,48±0,15 24,2%	0,71±0,18 35,9%	0,66±0,08 33,3%	0,64±0,08 32,3%
Вольтарен (10 мг/кг)	1,76±0,16 100%	0,35±0,09 19,9%*	0,32±0,08 18,2%*	0,37±0,08 21,0%*	0,35±0,08 19,9%*	0,17±0,03 9,7%*
Метоксаарад (39,8 мг/кг)	1,86±0,10 100%	0,27±0,07 14,5%*	0,19±0,08 10,2%*	0,23±0,07 12,4%*	0,18±0,04 9,7%*	0,10±0,08 5,4%*

Примечание: Знаком * обозначена достоверность различий с контролем (P<0,05).

фармацевтического анализа Национального фармацевтического университета.

В качестве модели коллагеноза использовали адьювантную болезнь, в патогенезе которой имеется реакция гиперчувствительности замедленного типа и аутоиммунные механизмы с преимущественной локализацией патологического процесса в суставах и миокарде. Изучение влияния метоксаарада на течение хронического воспаления проведено на модели адьювантного артрита у белых крыс. Воспаление правой задней конечности вызывали введением 0,1 мл адьюванта Фрейнда, который являлся взвесью убитой при 100°C вакцины БЦЖ в вазелиновом масле. Перед началом проведения эксперимента на белых крысах компоненты для приготовления адьюванта Фрейнда брали в следующих пропорциях: 7 мл вазелинового масла, 2 мл безводного ланолина, 3 мл физиологического раствора и 60 мл вакцины БЦЖ. Исследование инокуляции адьюванта проводили в течение 28 дней. Лечебно-профилактический эффект метоксаарада учитывали по способности уменьшать отек лапки, вторичные воспалительные изменения, периметр хвоста и нормализовать следующие гематологические показатели: скорость оседания эритроцитов (СОЭ), изменение лейкоцитарной формулы, способность предотвращать деструктивные изменения соединительной ткани коленных и голеностопных суставов, а также уменьшать дистрофические изменения миокарда. Данные параметры противовоспалительной активности регистрировали в начале и в конце эксперимента. В ходе опыта регистрировались объем лап, масса тела и уровень вторичных воспалительных поражений (степень воспаления ушей, передних лап, левой задней лапы). Объем пораженной лапки измеряли онкометрическим методом. гематологические показатели регистрировали трижды: исходный фон, на 14-е и 28-е сутки. Показатели клинического анализа крови определяли по общепринятым методикам [8]. Содержание животных и эксперименты проводились согласно положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», утвержденных Пятым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013).

Экспериментальные данные обрабатывали методами параметрической статистики с использованием t-критерия Стьюдента [3].

Результаты исследования и их обсуждение.

У животных с экспериментальным синдромом (контрольная группа) максимальный отек пораженной лапки наблюдали на 5-15 сутки после инокуляции адьюванта, что составило 35,9% по отношению к исходному значению объема (табл. 1).

На 10-14 сутки после введения адьюванта Фрейнда у животных наблюдалось воспаление голеностопного и коленного суставов, что выражалось в припухлости и гиперемии периартикулярных тканей. На 15 сутки появлялись гиперемия и отек контрлатеральной задней и передней лапок. У животных, получавших метоксаарад в дозе 39,8 мг/кг, прирост объема лапки на 5 и 15 сутки составил 14,5% и 12,4%, соответственно. Метоксаарад предотвращал проявление вторичных признаков экссудации, не наблюдались признаки артрита передних и задних лап. Вольтарен в дозе 10 мг/кг достоверно изменял воспалительную реакцию пораженной лапки, однако по антиэкссудативному эффекту он уступал метоксаараду. В данной группе животных прирост объема лапки на 5 и 15 сутки составил 19,9-21,0%, соответственно, что в 1,4-1,7 раза больше, чем у животных, пролеченных метоксаарадом (табл. 1).

Результаты анализа гематологических показателей крови у животных с экспериментальным адьювантным артритом свидетельствуют о наличии в организме животных воспалительного процесса. Скорость оседания эритроцитов у животных данной группы возросла (28 день опыта) по сравнению с исходным значением на 6,4 мм/час (табл. 2). У животных, пролеченных вольтареном и метоксаарадом, значение СОЭ находилось в пределах физиологической нормы в течение всего времени выполнения данной серии исследований. В контрольной группе животных наблюдался выраженный лейкоцитоз: общее количество лейкоцитов возросло на 14-е сутки в среднем на $4,3 \times 10^9$ /л, а на 28 сутки – на $16,3 \times 10^9$ /л (табл. 2).

Исследования влияния вольтарена и метоксаарада на время свертывания крови у белых крыс с адьювантной болезнью при их лечебно-профилактическом применении представлены в табл. 3. Анализ

Таблиця 2

Изменение скорости оседания эритроцитов и общего количества лейкоцитов при адьювантной болезни у белых крыс под действием вольтарена и метоксаарада (M ± m)

Серия опытов	Скорость оседания эритроцитов, мм/час			Общее количество лейкоцитов, 10 ⁹ л		
	исходные значения	на 14-й день опыта	на 28-й день опыта	исходные значения	на 14-й день опыта	на 28-й день опыта
Контроль	3,0±0,24	5,6±0,35	9,4±0,38	14,9±1,22	19,2±1,18	31,2±1,28
Вольтарен	2,3±0,29	2,1±0,14*	3,6±0,28*	14,1±1,18*	12,8±1,34*	17,2±1,19*
Метоксаарад	2,4±0,31	2,4±0,25*	3,6±0,25*	14,8±0,38*	17,0±0,49*	16,4±1,26*

Примечание: Знаком * обозначена достоверность различий с контролем (P < 0,05).

полученных результатов показывает, что в контрольной группе животных исходное время свертывания крови составило 72,1 сек, на 14 и 28 сутки отмечалось уменьшение времени свертывания крови в 1,39-1,41 раза. Лечение вольтареном привело к незначительному, но достоверному увеличению времени свертывания крови на 28 сутки и составило 13,5% к исходному значению. Существенное влияние на время свертывания крови оказывал метоксаарад, удлиняя его на 11 и 25,5% соответственно (табл. 3).

На 28 сутки опыта животных декапитировали под эфирным наркозом и проводили забор голеностопных и коленных суставов, а также миокарда для проведения патоморфологических исследований. Состояние суставов животных оценивали в баллах (от 0 до 3) в зависимости от степени выраженности изменений:

0 – отсутствие изменений в суставном хряще и капсуле сустава;

- + 1 – слабо выраженные изменения;
- + 2 – средне выраженные изменения;
- + 3 – выраженные изменения.

Макроскопически и микроскопически коленные суставы во всех исследованных группах соответствуют интактным, однако в голеностопных суставах выявлены изменения, характерные для каждой из исследованных групп.

В голеностопном суставе интактных животных, включая суставной хрящ, обнаруживались 3 зоны: поверхностная, промежуточная и глубокая, с относительно равномерным и характерным распределением клеток в этих зонах. Так, поверхностная зона состояла из одного ряда вытянутых клеток. В промежуточной зоне наряду с одиночно расположенными хондроцитами определялись изогенные группы из 2-3 клеток. В глубокой зоне клетки формировали колонковые структуры. Синовиальный слой капсулы состоял из 3-4 рядов синовиоцитов, а фиброзный слой был образован коллагеновыми волокнами с относительно упорядоченным расположением. Изменения суставов крыс данной группы оценивались в 0 баллов.

У животных с адьювантной болезнью макроскопически в голеностопных суставах определялся выраженный отек периаартикулярных тканей, повышенное количество синовиальной жидкости

Таблиця 3

Время свертывания крови у крыс с адьювантной болезнью при лечебно-профилактическом применении вольтарена и метоксаарада (M ± m)

Серия опытов	Время свертывания крови в сек.		
	Исходный фон	На 14-й день	На 28-й день
Контроль	72,1±3,68	51,9±2,67 p > 0,05	51,0±2,29 p > 0,05 p ³ > 0,05
Вольтарен	75,6±2,22	78,4±2,65 p > 0,05	85,8±3,56 p > 0,05 p ¹ > 0,05 p ³ > 0,05
Метоксаарад	73,7±3,15	81,8±2,66 p > 0,05 p ¹ > 0,05 p ² > 0,05	92,5±3,78 p > 0,05 p ¹ > 0,05 p ² > 0,05 p ³ > 0,05

Примечание: p – достоверность по отношению к исходному фону; p¹ – достоверность по отношению к контролю; p² – достоверность по отношению к вольтарену; p³ достоверность по отношению к животным той же группы на 14-й день опыта.

кровянистого цвета, выраженная гиперемия синовиальной оболочки. Изменения суставов у крыс данной группы оценивались в 2,5-3 балла. В группе, леченой метоксаарадом, макроскопически сустав сохранял строение, характерное для интактного. Микроскопически, в большинстве случаев, сустав без изменений. Изменения суставов в данной группе оценивались в 0-1 баллов. В группе, получавшей вольтарен, макроскопически сустав сохранил строение, характерное для интактного. Микроскопически определились локальные участки хряща, не содержащие клеток. Изменения суставов животных, леченных вольтареном, оценивались 1,5 балла.

При патоморфологическом исследовании миокарда крыс с адьювантной болезнью (вторая группа) выявлялся интерстициальный и перикапиллярный отек, разрастание соединительной ткани, увеличение коллагеновых фибрил, что связано с повышенной активностью фибробластов. В мышечной соединительной ткани расположены многочисленные гиперемированные капилляры, что свидетельствует об их повышенном тонусе. В просвете

сосудов микроциркуляторного русла миокарда наблюдали скопление эритроцитов, что приводит к замедлению тока крови и образованию микротромбов в мелких артериях. В процессе терапии метоксарадом структурная организация стромального компонента миокарда животных (третья группа) мало отличается от таковой, характерной для нормы. Капилляры полнокровны, в некоторых участках миокарда выявляется умеренный перикапиллярный отек и частичное разрыхление базальной мембраны капилляров. У крыс, леченных вольтареном (четвертая группа) в участках миокарда обнаружен умеренный интерстициальный отек, вблизи сосудов интрамурального русла наблюдается пролиферация фибробластов, увеличение содержания коллагеновых фибрилл и накопления гликозаминогликанов. Многочисленные капилляры открыты, в просвете выявлялись отдельные эритроциты.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о достаточно высокой противовоспалительной активности метоксарада. В эксперименте соединение обнаружило следующие особенности: предотвращало развитие системного поражения суставов, снижало процент деструктивных изменений в суставах, активировало процессы репаративной регенерации первоначально поврежденных экспериментальной адьювантной болезнью ультраструктур мышечных клеток сердца. Метоксарад нормализовал гематологические показатели лабораторных крыс. Известно, что при воспалении изменяются также и реологические свойства крови за счет изменения белковых фракций крови, увеличения содержания фибрина в плазме, что ведет к сокращению времени свертывания крови [6]. Метоксарад увеличивал время свертывания крови на 25,5%. Животные хорошо переносили введение метоксарада, выраженных изменений в общем состоянии и поведении животных в опытах не выявлено.

Выводы

1. Введение адьюванта Фрейнда вызывало полиартритные поражения суставов у крыс и изменения гематологических показателей у экспериментальных животных (выраженный лейкоцитоз, ускорение СОЭ), а также приводило к возникновению грубых деструктивно-дистрофических нарушений в суставах, развитию дистрофических изменений миокарда и нарушению микроциркуляции.

2. В условиях терапии вольтареном уменьшалась степень структурно-метаболических нарушений, не наблюдались признаки хронического процесса, значение СОЭ и количество лейкоцитов находилось в пределах физиологической нормы в течение всего эксперимента. В миокарде крыс, леченных вольтареном, уменьшался перикапиллярный и интестрициальный отек, гемокоагуляция, однако, наблюдалась повышенная пролиферация фибробластов, следствием которой явилось увеличение содержания коллагеновых фибрилл и накопление гликозаминогликанов.

3. Установлено, что метоксарад обладает достаточным антиэкссудативным действием при хроническом воспалительном процессе у экспериментальных животных, предотвращает проявления вторичных признаков экссудации и по антиэкссудативному эффекту сравним с вольтареном. Введение метоксарада нормализовало гематологические показатели у лабораторных животных с экспериментальной адьювантной болезнью, полностью купировало воспалительный процесс в суставах, а также предупреждало развитие грубых изменений стромального компонента миокарда и вызывало активацию процессов репаративной регенерации.

Перспективы дальнейших исследований. Совокупность изученных фармакологических свойств делает метоксарад перспективным соединением для дальнейшего изучения с целью создания на его основе лекарственного средства с противовоспалительными и антиэкссудативными свойствами.

Список литературы

1. Георгіянц В. А. Синтез та дослідження 1-бензил-1,2-,3-тріазол(1Н)- 4,5-дикарбонових кислот / В. А. Георгіянц, Л. О. Перехода, С. В. Плис // Вісник Фармації. – 2012. – № 2 (42). – С. 3-6.
2. Дзяк Г. В. Новые направления и перспективы противовоспалительной терапии в ревматологии / Г. В. Дзяк // Матер. Укр. ревматолог. школы. – 2002. – С. 24-41.
3. Лапач С. Н. Статистические методы в медико- биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач. – К. : МОРИОН, 2000. – 320 с.
4. Мазуров В. И. Клиническая ревматология / В. И. Мазуров. – М. : ФОЛИАНТ, 2015. – 520 с.
5. Насонов Е. Л. Противовоспалительная терапия ревматических болезней / Е. Л. Насонов. – М. : М – СИТИ, 2015. – 182 с.
6. Насонова В. А. Фармакотерапия ревматических заболеваний / В. А. Насонова. – М. : ЛИТТЕРРА, 2015. – 507 с.
7. Роман О. М. Поиск биологически активных соединений среди арилимидов 5-арилиденроданин-3-карбоновых кислот / О. М. Роман, Р. Б. Лесык, И. А. Нектечаев // Фармац. журн. – 2009. – № 5. – С. 47-51.
8. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : Метод. Рекоменд. / За ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіценна, 2001. – 528 с.
9. Шухов В. С. О нестероидных противовоспалительных средствах / В. С. Шухов // Лечащий врач. – 2004. – № 2. – С. 48-51.
10. Ashton M. Disparate effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on apoptosis by diclofenac / M. Ashton, P. Hanson // Br. J. Pharmacol. – 2012. – Vol. 135 (2). – P. 407-416.
11. Graham D. Y. Strategies to prevent NSAID – induced upper GI complications/ D. Y. Graham // DDW. – 2010. – Scientific sessions handouts. – P. 81-83.

УДК 615. 01. 547:615. 461. 2

ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИЕКСУДАТИВНОЇ ДІЇ НОВОЇ ПОХІДНОЇ ОКСАМІНОВОЇ КИСЛОТИ

Литвинова О. М.

Резюме. Вивчені деякі сторони механізму протизапальної дії нового похідного оксамінової кислоти – метоксараду на перебіг хронічного запального процесу, близького по патогенезу і морфофункціональним змінам до колагенозів людини. Встановлено, що метоксарад володіє достатньою терапевтичною дією при хронічному запальному процесі у експериментальних тварин. Введення метоксараду купірувало процес запалення в суглобах у лабораторних тварин, нормалізувало показники крові, запобігало розвитку системного ураження суглобів, знижувало відсоток деструктивних змін у суглобах, попереджало розвиток грубих змін строми міокарду, активувало процеси репаративної регенерації раніш пошкоджених експериментальної ад'ювантної хворобою ультраструктур м'язових клітин серця. Доцільно подальше вивчення метоксараду з метою створення нового лікарського засобу з протизапальними та антиексудативними властивостями.

Ключові слова: запалення, модель ад'ювантної хвороби, похідні оксамінової кислоти, протизапальна дія.

UDC 615. 01. 547:615. 461. 2

Experimental Study of Aspects of Therapeutic Action of New Derivative of Oxaminic Acid

Litvinova O. N.

Abstract. Some aspects of the mechanism of the anti-inflammatory action of oxaminic acid such as metoxarade during chronic inflammatory process were studied.

The purpose of the investigation was to elicit the mechanism of the anti-inflammatory action of metoxarade, to study its influence on the chronic process which is close to the pathogenesis and morphofunctional changes to the connective tissue disease (collagenoses).

The specific activity of metoxarade according to the Methodical recommendations on experimental (preclinical) research of NSAIDs was being studied. Metoxarade is a white powder with a melting point of 203-205 °C, soluble in DMF and sparingly soluble in water. This compound has been synthesized at the Department of Pharmaceutical Analysis of the National University of Pharmacy.

As a model of collagenoses the adjuvant disease has been used, in the pathogenesis of which there is a reaction of hypersensitivity of the delayed type and autoimmune mechanisms with preferentially localized disease process in joints and myocardium. The study of the effect of metoxarade on chronic inflammation has been performed on the adjuvant arthritis model in white rats.

Therapeutic and prophylactic effect of metoxarade was assessed due to its ability to reduce the swelling of the foot, secondary inflammatory changes, perimeter of the tail and to normalize the following hematological parameters: erythrocyte sedimentation rate (ESR), a change in leukocyte counts, the ability to prevent destructive changes in the connective tissue of the knee and ankle joints, as well as to reduce the dystrophic changes in the myocardium. These parameters of anti-inflammatory activity were recorded at the beginning and the end of the experiment.

During the experiment, the volume of feet, body weight and level of secondary inflammatory lesions (the level of inflammation of ears, forelegs, left hind foot) were being registered. The volume of the affected foot was measured by oncometric method. Hematological parameters were recorded three times: the original background, on the 14th and 28th day. Indicators of clinical blood count were determined due to conventional techniques.

The introduction of Freund's adjuvant caused polyarthritis joint damage in rats and changes of hematological parameters in experimental animals (pronounced leukocytosis, accelerated ESR), and led to the emergence of gross destructive and dystrophic disorders of the joints, the development of degenerative changes of the myocardium and disturbance of microcirculation.

Received results indicated high anti-inflammatory activity of metoxarade: adhesion prevents the development of systemic joint's damage, decreased the percent of destructive changes in the joints, and promoted the process of restorative regeneration of damaged muscular cells of the heart by experimental adjuvant disease. In animals which received metoxarade in the dose of 39,8 mg/kg, it prevented the presence secondary signs of exudation and also there were absent signs of arthritis of forelegs and hind feet. Metoxarade normalized hematological indices of rats, increased the time of blood coagulation on 25,5%. Metoxarade's intake was tolerated by animals well, significant changes in general condition and animal's behavior in experiments were not determined.

It is necessary and important to study the action of metoxarade in order to create new medicinal agent with anti-inflammatory and antiexudative peculiarities.

Keywords: inflammation, derivative of oxaminic acid, model of adjuvant disease, anti-inflammatory action.

Стаття надійшла 12. 11. 2015 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування