

CD16<sup>+</sup>lymphocytes, increased immunoregulatory index. We also marked both an increase and decrease in the number of lymphocytes with activating phenotype in boxers. Boxers with TBI are characterized by disorders of cellular and humoral immunity. The differences in the composition of the main lymphocyte subpopulations showed a diversity of their involvement in the pathogenesis of traumatic disease of the brain.

**Key words:** traumatic brain injury, boxer, cellular and humoral immunity.

P.L. Shupyk National medical Academy of postgraduate education (Kyiv)

Рецензент – доц. Н.М. Каспрук

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 3 (75). – P. 109-114

Надійшла до редакції 18.05.2015 року

© А.В. Муравський, 2015

УДК 615.212.3:616.832-004.2-092.9

*О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур*

## ЗМІНИ НОЦИЦЕПТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ТА АКТИВНОСТІ PGH-СИНТЕТАЗИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЕКВІВАЛЕНТА РОЗСІЯНОГО СКЛЕРОЗУ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

**Резюме.** Розсіяний склероз (РС) – захворювання, при якому імунна система людини руйнує захисну (мієлінову) оболонку, що оточує нерви. Точні причини виникнення розсіяного склерозу невідомі. Вважається, що РС – це аутоімунне захворювання, при якому імунна система руйнує свої власні тканини. У ході цього процесу розвивається деструкція мієліну – спеціального шару, який покриває і захищає нервові волокна головного та спинного мозку.

Метою даної роботи була експериментальна оцінка впливу низки відомих нестероїдних протизапальних лікарських засобів (НПЗЛЗ) (диклофенак натрію, мелоксикам, ібупрофен, лорноксикам та целекоксиб) на формування ноцицептивної відповіді та на рівень акти-

вності простагландин-синтетази (PGH-синтетази) в головному та спинному мозку у щурів з експериментальним еквівалентом розсіяного склерозу з урахуванням базової патогенетичної терапії метилпреднізолоном. Встановлено, що в ряду НПЗЛЗ максимальний протизапальний потенціал виявляв мелоксикам, котрий (з урахуванням базової терапії метилпреднізолоном) характеризувався високим рівнем знеболювальної дії (+186 %,  $p \leq 0,05$ ) та знижував активність PGH-синтетази в головному та спинному мозку у 2,0 ( $p \leq 0,05$ ) та у 1,7 ( $p \leq 0,05$ ) рази відповідно у порівнянні з показниками групи контролю.

**Ключові слова:** розсіяний склероз, PGH-синтетаза, знеболення, головний та спинний мозок.

**Вступ.** На сьогодні етіологія розсіяного склерозу і патогенетичні механізми, що лежать в основі його розвитку і прогресування, багато в чому залишаються неясними. Проте змінилося уявлення про саму сутність РС як захворювання, що «уражує мієлінові оболонки провідників головного і спинного мозку», при якому періоди загострень змінюються періодами повного або майже повного клінічного благополуччя [6]. В останні роки з'являється все більше даних, що свідчать про значну, якщо не провідну роль нейродегенеративних процесів у патогенезі розсіяного склерозу: стає очевидним, що вже на ранніх етапах РС розвивається нейрональне і аксональне нейродегенеративне пошкодження [8]. При цьому деструкція аксонів спостерігається не тільки у вогнищі демієлінізації, але і розповсюджується упродовж всього аксонального волокна [9, 10].

Тому питання профілактики та лікування демієлінізації, котра в першу чергу пов'язана із запальним процесом, є актуальним та перспективним. Серед препаратів із вираженим протизапальним ефектом лідером є група нестероїдних проти-

запальних лікарських засобів (НПЗЛЗ). Однак відомо, що тривале використання НПЗЛЗ, механізм дії яких опосередковується гальмуванням циклооксигенази 2-го типу (ЦОГ-2), підвищує ризик виникнення інсульту та інфаркту міокарда, котрі виникають внаслідок блокування вазодилаторної дії  $PGI_2$ , який утворюється під впливом ЦОГ-2. Блокування ЦОГ також зменшує продукцію  $PGD_2$ , котрий у периферичних тканинах стимулює вазодилатацію та інгібує агрегацію тромбоцитів. Також  $PGD_2$  є найбільш поширеним простагландином у головному мозку, який опосередковує нейропротекторну дію в нейронах гіпокампа [11].  $PGD_2$  існує протягом дуже короткого періоду часу і піддається дегідратації *in vivo* та *in vitro* з утворенням біологічно активних простагландинів серії  $J_2$ , зокрема, 15-дезоксипростагландину  $J_2$  ( $15d-PGJ_2$ ). Цей простагландин є природним хімічно стійким протизапальним похідним  $PGD_2$  з вираженим протизапальним ефектом, який може сприяти терапії нейродегенеративних захворювань (хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона), зокрема розсіяного склерозу [12].

© О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, 2015

**Мета дослідження.** Експериментальна оцінка впливу низки відомих НПЗЛЗ (диклофенак натрію, мелоксикам, ібупрофен, лорноксикам та целекоксиб) на формування ноцицептивної відповіді та на рівень активності простагландинсинтетази (PGH-синтетази) у головному та спинному мозку у щурів з експериментальним еквівалентом розсіяного склерозу з урахуванням базової патогенетичної терапії метилпреднізолоном.

**Матеріал і методи.** Дослідження проведенні на 64 білих безпородних щурах, масою 180-230 г, які утримувались у стандартних умовах віварію ДЗ «ДМА МОЗ України» [4]. Дослідження виконувались відповідно до принципів Гельсінкської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (2000 р.), Конвенції Ради Європи у правах людини та біомедицини (1997 р.), відповідних положень ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983 р.), «Загальним етичним принципам експериментів над тваринами», що затверджені І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) згідно з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях». Експеримент складався з двох етапів: І етап – реєстрація ноцицептивної відповіді (термоподразнення хвоста) при введенні знеболювальних засобів у щурів з експериментальним еквівалентом розсіяного склерозу – експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) на тлі 5-денної терапії метилпреднізолоном; ІІ етап дослідження – декапітація тварин після визначення болювого порогу на тлі введення знеболювальних засобів, виділення структур головного та спинного мозку та визначення рівня активності простагландинсинтетази (PGH – синтетази).

Тварин методом випадкової вибірки розподілили на вісім дослідних груп (n=8), котрим вводили знеболювальні засоби сумісно з метилпреднізолоном 3,4 мг/кг протягом п'яти днів та за умов сформованого ЕАЕ: І група – контроль (ЕАЕ без лікування); ІІ група – ЕАЕ + метилпред-

нізолон (М), ІІІ група – ЕАЕ + М + диклофенак натрію 10 мг/кг, ІV група – ЕАЕ + М + целекоксиб (50 мг/кг); V група – ЕАЕ + М + мелоксикам (10 мг/кг); VI група – ЕАЕ + М + лорноксикам (10 мг/кг); VII група - ЕАЕ + М + ібупрофен (10 мг/кг) та VIII група – інтактні тварини.

Для відтворення ЕАЕ застосовували метод введення енцефалітогенної емульсії внутрішньошкірно в основу хвоста щурів [2, 5].

У тварин зі сформованим ЕАЕ оцінку болювої реакції проводили на моделі термоподразнення хвоста ( $t=60^{\circ}\text{C}$ ) за умов сформованого ЕАЕ (12-й день дослідження) та на тлі 5-денного введення метилпреднізолону сумісно з дослідним анальгетиком через 90 хвилин після введення досліджуваних засобів.

PGH-синтетазну активність ферменту визначали спектрофотометричним методом за допомогою СФ-56 ЛОМО - спектр. У кювету, котра вміщує 1 мл буфера, додавали розчин 2мкМ геміну («Синбіас»), донор електронів (0,99 мМ розчин адреналіну («ALDRICH», Germany)) та солюбілізований препарат ферменту. Гомогенати тромбосми та тканини мозку готували з використанням буферного розчину 0,05М трис- HCl, рН-7,5 та центрифугували 20 хвилин при 13 об/хв. Надосадову рідину зберігали при температурі від  $-18^{\circ}\text{C}$  до  $-25^{\circ}\text{C}$ . Солюбілізований препарат ферменту готували із використанням ТВІН – 20 (USA). Реакцію ініціювали додаванням спиртового розчину 0,19 мМ арахідонової кислоти («ALDRICH», Germany). Довжина хвилі складала 480 нм, час реєстрації показників - 3 хвилини після додавання арахідонової кислоти. Питому активність виражали в мікромолях арахідонової кислоти, окиснених 1 мг білка протягом 3 хвилин [7].

Всі отримані дані опрацьовані загальноприйнятими в медико-біологічних дослідженнях методами статистичного аналізу з використанням стандартних пакетів комп'ютерних програм [3].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Першим етапом нашого дослідження було відтворення ЕАЕ: пік змін поведінки та проявів порушення рухової активності у тварин формувался

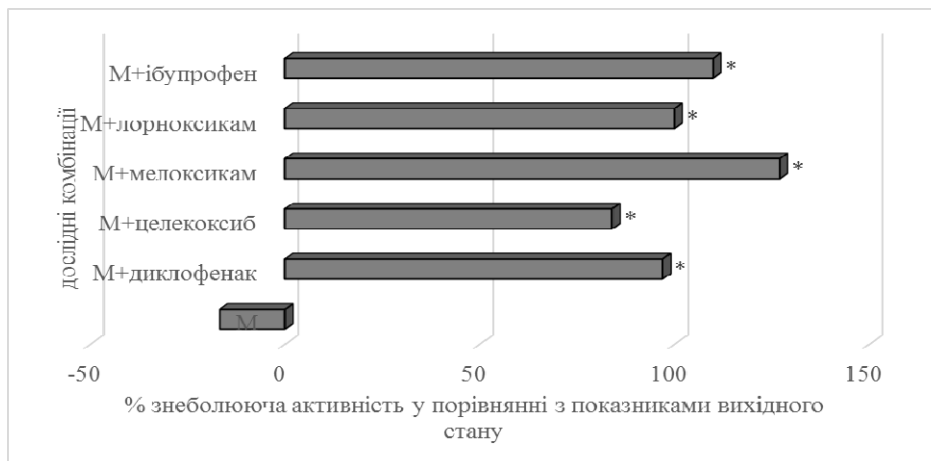


Рис. Зміни ноцицептивного потенціалу НПЗЛЗ за умов сформованого експериментального еквіваленту розсіяного склерозу на тлі 5-денної терапії метилпреднізолоном

Таблиця

## Рівень активності PGH-синтетази в гомогенаті головного та спинного мозку у тварин з експериментальним еквівалентом РС

№	Дослідні групи	PGH-синтетаза, мкмоль/хв/мг білка	
		Головний мозок	Спинний мозок
1	I група (ЕАЕ контроль)	49,2±6,9	37,3±3,1
2	II група (ЕАЕ + Метилпреднізолон)	32,9±4,3	30,4±3,6
3	III група (ЕАЕ + М + диклофенак)	24,7±2,6	28,4±4,0
4	IV група (ЕАЕ + М + целекоксиб)	24,4±2,3	24,6±1,6
5	V група (ЕАЕ + М + мелоксикам)	24,1±4,2	21,4±2,3
6	VI група (ЕАЕ + М + лорноксикам)	30,9±2,1	28,7±2,6
7	VII група (ЕАЕ + М + ібупрофен)	26,5±2,9	23,9±2,1
8	VIII група (інтактні)	17,5±2,4	14,5±1,0

Примітка. \* - вірогідно  $p \leq 0,05$  порівняно з показниками інтактних тварин; PGH – простагландин; РС – розсіяний склероз; ЕАЕ – експериментальний алергічний енцефаломієліт; М -- метилпреднізолон

до 12-ї доби дослідження; протягом наступних п'яти днів щури отримували метилпреднізолон у дозі 3,4 мг/кг як базову патогенетичну терапію сумісно з дослідним знеболювальним засобом у групах, які зазначені вище.

Встановлено, що у вихідному стані при оцінці анальгетичної активності (12-й день експерименту) у щурів всіх груп спостерігався знижений поріг ноцицептивної відповіді: від  $2,25 \pm 1,03$  с для групи контролю до  $3,25 \pm 0,56$  с для V групи.

Результати дослідження змін анальгетичної активності представлені на рисунку. Показано, що анальгетичний потенціал дослідних засобів сумісно з метилпреднізолоном коливався в межах від 84% ( $p \leq 0,05$ ) для групи IV (М + целекоксиб) до 127,3 % ( $p \leq 0,05$ ) для групи V (М + мелоксикам). Нами проведений порівняльний аналіз знеболювальної активності комбінацій метилпреднізолону з анальгетиками з показниками групи, що отримувала монотерапію метилпреднізолоном за умов сформованого ЕАЕ. Встановлено, що дослідні комбінації можна розташувати у такому порядку по формуванню ноцицептивної відповіді: М + мелоксикам (+186 % ( $p \leq 0,05$ ))  $\leq$  М + лорноксикам (+174 % ( $p \leq 0,05$ ))  $\leq$  М + ібупрофен (+157,4 % ( $p \leq 0,05$ ))  $\leq$  М + диклофенак натрію (+ 154,4 % ( $p \leq 0,05$ ))  $\leq$  М + целекоксиб (+131,5 % ( $p \leq 0,05$ )).

Варто відзначити, що у порівнянні з показниками групи контролю на тлі отримання анальгетиків сумісно з метилпреднізолоном показник ноцицептивної відповіді на термодразнення хвоста у щурів збільшився в 4,4 – 5,9 рази ( $p \leq 0,05$ ).

Наступним етапом нашого дослідження стало визначення рівня активності PGH-синтази в структурах головного та спинного мозку (табл.). За умов формування ЕАЕ в групі контролю зареєстровано збільшення рівня PGH-синтази у 2,8 рази ( $p \leq 0,05$ ) та у 2,6 рази ( $p \leq 0,05$ ) порівняно з показниками інтактних тварин відповідно в головному та спинному мозку.

У II групі, тварини якої отримували метилпреднізолон, наприкінці експерименту зареєстроване зменшення активності PGH-синтетази на 33,1% ( $p \leq 0,05$ ) та на 18,5% ( $p \geq 0,05$ ) порівняно з показниками групи контролю відповідно в головному та спинному мозку.

Взагалі на тлі 5-денного уведення метилпреднізолону сумісно зі знеболювальними засобами показано вірогідне зниження активності PGH-синтетази як у головному, так і в спинному мозку. Так, сумісне використання М із диклофенаком натрію, целекоксибом та мелоксикамом сприяло зниженню PGH-синтетази на 49,8 % ( $p \leq 0,05$ ), 50,4 % ( $p \leq 0,05$ ) та 51 % ( $p \leq 0,05$ ) відповідно, порівняно з показниками групи контролю в структурах головного мозку. Проте ці ж НПЗЛЗ не так рівномірно знижували активність PGH-синтетази в спинному мозку: на 23,9 % ( $p \leq 0,05$ ) для М + диклофенак, на 34 % ( $p \leq 0,05$ ) для М + целекоксиб та на 47,4 % ( $p \leq 0,05$ ) для М + мелоксикам порівняно з показниками групи контролю.

У групах VI та VII результати мали схожий характер тенденції зниження рівня PGH-синтетази як у головному, так і спиному мозку. У результаті аналізу отриманих даних можна відзначити найбільш перспективний НПЗЛЗ як знеболювального засобу з можливою нейропротекторною та протизапальною активністю, а саме, мелоксикам.

## Висновок

Таким чином, у ряду нестероїдних протизапальних лікарських засобів (диклофенак натрію, целекоксиб, мелоксикам, лорноксикам та ібупрофен) максимальний протизапальний потенціал виявляв мелоксикам, котрий (з урахуванням базової терапії метилпреднізолоном) характеризувався високим рівнем знеболювальної дії (+186 % ( $p \leq 0,05$ )) та знижував активність PGH-синтетази в головному та спиному мозку у 2,0 ( $p \leq 0,05$ ) та у 1,7 ( $p \leq 0,05$ ) рази відповідно, порівняно з показниками групи контролю.

**Перспективи подальших досліджень.** З урахуванням отриманих результатів цього дослідження нами планується дослідити вплив антико-нвульсантів та антидепресантів як знеболювальних засобів при експериментальному еквіваленті розсіяного склерозу з урахуванням базової терапії метилпреднізолоном при хронічному больовому синдромі нейропатичного типу.

#### Література

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / за ред. О.В. Стефанова. – К.: видавничий дім «Авіцена», 2001. – С. 300-301.
2. Донченко Г.В. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит: некоторые показатели энергетического, белкового и липидного обмена / Г.В. Донченко, А.П. Клименко, Т.М. Кучмеровская // Нейрохимия. – 2007. – № 3. – С. 232-238.
3. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2001. – 408 с.
4. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко, Г.А. Сайретдінова. – К., 2002. – 155 с.
5. Нефьодов О.О. Моделирование та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, Ю.В. Харченко // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2014. – Вып. 4. – Т. 2 (114). – С. 205-208.
6. Рассеянный склероз: руководство для врачей / Т.Е. Шмидт, Н.Н. Яхно. – 2-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2010. – 272 с.
7. Экспериментальное включение арахидоновой кислоты в макрофаги / М.Л. Строкин, М.Г. Сергеева, А.Т. Мевх [и др.] // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 3. – С. 386-393.
8. Design, synthesis and evaluation of a series of non-steroidal anti-inflammatory drug conjugates as novel neuroinflammatory inhibitors / Z. Xu, J. Wu, J. Zheng [et al.] // Int. Immunopharmacol. – 2015. – Vol. 25, № 2. – P. 528-537.
9. Giuliani F. Immune-mediated neurodegeneration and neuroprotection in MS / F. Giuliani, V.W. Yong // Int. MS. J. – 2003. – № 10. – P. 122-130.
10. Multiple sclerosis – candidate mechanisms underlying CNS atrophy / V. Siffrin, J. Vogt, H. Radbruch [et al.] // Trends. Neurosci. – 2010. – Vol. 33, № 4. – P. 202-210.
11. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis / G.C. DeLuca, K. Williams, N. Evangelou [et al.] // Brain. – 2006. – Vol. 129, Pt. 6. – P. 123-127.
12. The cyclooxygenase-2 pathway via the PGE<sub>2</sub> EP2 receptor contributes to oligodendrocytes apoptosis in cuprizone-induced demyelination / S. Palumbo, C.D. Toscano, L. Parente, [et al.] // J. Neurochem. – 2012. – Vol. 121, №3. – P. 418-427.

## ИЗМЕНЕНИЯ НОЦИЦЕПТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА И АКТИВНОСТИ PGH-СИНТЕТАЗЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

*А.А. Нефедов, В.Й. Мамчур*

**Резюме.** Рассеянный склероз – заболевание, при котором иммунная система человека разрушает защитную оболочку, покрывающую нервы (миелиновая оболочка). Точные причины возникновения рассеянного склероза неизвестны. Считается, что это аутоиммунное заболевание, при котором иммунная система разрушает свои собственные ткани. При рассеянном склерозе в ходе этого процесса разрушается миелин – специальный слой, который покрывает и защищает нервные волокна головного и спинного мозга. Целью работы стала экспериментальная оценка влияния распространенных нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) (диклофенак натрия, мелоксикам, ибупрофен, лорноксикам и цецекоксиб) на формирование ноцицептивного ответа и на уровень активности простагландин-синтетазы (PGH-синтетазы) в головном и спинном мозге у крыс с экспериментальным эквивалентом рассеянного склероза с учетом базовой патогенетической терапии метилпреднизолоном. В результате исследования установлено, среди ряда НПВП наиболее перспективным патогенетическим (противовоспалительным) механизмом действия является мелоксикам, который с учетом базовой терапии метилпреднизолоном определил высокий уровень болеутоляющей активности (+186% (p≤0,05)) и снижение активности PGH-синтетазы в головном и спинном мозге в 2,0 (p≤0,05) и в 1,7 (p≤0,05) раза соответственно, по сравнению с показателями группы контроля.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, PGH-синтетаза, обезболивание, головной и спинной мозг.

## CHANGES IN NOCICEPTIVE POTENTIAL AND ACTIVITY OF PGH-SYNTHEASE IN EXPERIMENTAL EQUIVALENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

*A.A. Nefedov, V.I. Mamchur*

**Abstract.** Multiple sclerosis is a disease in which the immune system destroys the protective sheath that covers the nerves (myelin sheath). The exact cause of multiple sclerosis is unknown. It is believed that this is an autoimmune disease in which the immune system destroys its own tissues. In multiple sclerosis in the process myelin -a special layer that covers and protects the nerve fibers of the brain and spinal cord -is destroyed. The paper is aimed at an experimental evaluation of the impact of common NSAIDs (diclofenac sodium, meloxicam, ibuprofen, celecoxib and lornoxicam) on the formation of nociceptive responses and the activity level of prostaglandin synthetase (PGH) in the brain and spinal cord in rats with experimental equivalent of MS based on the basic pathogenetic methylprednisolone therapy. The study found that among the series of NSAIDs the most promising of pathogenic (anti-inflammatory) mechanism of action is meloxicam, which considering the basic methylprednisolone therapy identified high analgesic activity (+ 186 % (r≤0,05)) and reduction of PGH-synthetase mactivity in brain and spinal cord in 2.0 (r≤0,05) and 1.7 (r≤0,05) times respectively compared with the control group.

**Key words:** multiple sclerosis, PGH-synthetase, anesthesia, brain, spinal cord.

SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine" (Dnipropetrovsk)

Рецензент – проф. І.І. Заморський

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 3 (75). – P. 114-117