

место в 75,3% случаях. Проведенные исследования показали ключевую роль хронического воспалительного процесса гениталий в патогенезе трубной беременности.

**Ключевые слова:** патоморфология, иммуногистохимия, децидуальная оболочка, хорион, трубная беременность.

**Brazhuk M.V., Kondratyuk V.P., Dzis N.P.**

### THE PATHOMORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES OF DECIDUA AND CHORION IN WOMEN WITH TUBAL PREGNANCY

**Summary.** A histological and immunohistochemical study of 85 surgical samples of the material (areas of fallopian tube, the fertilized egg, areas of ovaries, decidua, curettage of the uterus) from women with tube pregnancy was made. For ectopic nidation typical is a sharp decrease in proliferative processes in the chorale tissue, as evidenced by the downregulation proliferative marker Ki-67 in the chorionic villi, combined with a sharp decline or no expression of endothelial factor SD31 in vascular endothelium of chorion structures and of the fallopian tube background of chronic salpingitis, which occurred in 75,3% of cases. These studies have shown the key role of chronic inflammation in the pathogenesis of genital tubal pregnancy.

**Key words:** pathomorphology, immunohistochemistry, decidua, chorion, tubal pregnancy.

Стаття надійшла до редакції 23. 12. 2014 р.

*Бразжук Марина Дмитрівна* - лікар відділення реабілітації репродуктивної функції жінок, ДУ "Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України"; +38 097 944-28-80; marinabrazhuk@bigmir.net

*Кондратюк Валентина Константинівна* - д.мед.н., головний науковий співробітник відділення планування сім'ї ДУ "Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України"; +38 050 334-53-87; kondratiuk\_valentina@mail.ru

*Дзись Наталія Петрівна* - д.мед.н., професор кафедри акушерства та гінекології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 067 986-18-82; nata.d@list.ru

© Волощук Н.І., Таран І.В., Конюх С.А.

УДК: 577.81: 577.1: 591.4: 615.03

**Волощук Н.І., Таран І.В., Конюх С.А.**

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, кафедра фармакології (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

## ВПЛИВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА АНАЛЬГЕЗУЮЧИЙ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИЙ ЕФЕКТИ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**Резюме.** В експериментах на лабораторних щурах та мишах визначали вплив гідроген сульфідну на анальгезуючий та протизапальний ефекти диклофенаку натрію. Антиноціцептивну та антифлогенну дію донора гідроген сульфідну ( $\text{NaHS}$  в дозі 1,5 мг/кг в/оч), диклофенаку (8 мг/кг в/шл) та їх комбінації вивчали на моделях електричного подразнення, формалінового і карагенінового набряків. Було встановлено, що натрій гідроген сульфід зменшував прояви запального процесу та проявляв помірну антиноціцептивну дію у інтактних тварин та виразний анальгетичний ефект при експериментальному запаленні. Його введення посилювало фармакологічну дію диклофенаку натрію. Таким чином, спроможність гідроген сульфідну модулювати фармакодинаміку НПЗЗ може бути перспективним напрямком підвищення ефективності та безпеки фармакотерапії препаратами цієї групи.

**Ключові слова:** гідроген сульфід, диклофенак натрію, формаліновий тест, карагеніновий набряк, протизапальна, анальгезуюча дія.

### Вступ

Ефективне та безпечно лікування больових синдромів залишається пріоритетним напрямком наукових досліджень у всьому світі. Поряд з пошуком і створенням нових анальгезуючих засобів, досить перспективним є більш раціональне використання вже існуючих препаратів, якому передують ретельне вивчення різних факторів (як екзо-, так і ендогенного характеру), здатних модулювати фармакодинамічні та фармакокінетичні параметри лікарських засобів. Серед цих чинників викликає інтерес така вазоактивна молекула як гідроген сульфід ( $\text{H}_2\text{S}$ ). В арсеналі біологічних ефектів гідроген сульфідну описані: участь у регуляції судинного тону, нейротрансмісії, іотропний вплив на міокард, стимулювання продукції інсуліну і т.п. [Li et al., 2006; Lowicka, Beltowski, 2007; Caliendo et al., 2010]. Цей фізіологічний месенджер, поряд з простагландинами, ліпоксинами та ін., відіграє важливу роль у забезпеченні цитопротекції

шлунка. Було показано, що ендогенний  $\text{H}_2\text{S}$  захищає слизову оболонку шлунка на різних моделях експериментальних виразок у щурів, в тому числі, і індукованих нестероїдними протизапальними засобами (НПЗЗ) [Волощук, 2014; Wallace et al., 2007; Mard et al., 2012]. У літературі зустрічаються відомості про участь цієї молекули в модулюванні запального процесу і перцепції, проте, це питання залишається до кінця не з'ясованим, оскільки дані літератури у багатьох питаннях суперечать один одному [Li et al., 2006; Zanardo et al., 2006; Lee et al., 2009]. Залишаються невідомими механізми реалізації цих ефектів, а також вплив гідроген сульфідну на фармакологічну активність лікарських засобів з анальгезуючою та протизапальною діями.

Тому метою проведеного дослідження було визначення впливу гідроген сульфідну на анальгезуючу та протизапальну дію диклофенаку натрію.

## Матеріали та методи

Дослідження проведені на самцях білих нелінійних щурів масою 200-220 г і мишей масою 25-29 г. Тварини утримувалися на стандартному раціоні в умовах віварію Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова з доступом до води *ad libitum*. Температура повітря  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , відносна вологість повітря 40-60%, світлий/темний цикл: 12/12 годин. Всі дослідження проведені згідно Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 року про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях. Експериментальні тварини були розділені на 4 групи. Щурам I і III груп внутрішньоочеревинно протягом 5 днів вводили донор гідроген сульфід  $\text{NaHS}$  (Sigma, США) на фосфатному буфері (рН 7,4) в умовно-терапевтичній дозі 1,5 мг / кг, яка була визначена раніше [Волощук, Таран, 2011]. Тваринам II та IV груп вводили еквівалентні кількості розчинника. Диклофенак натрію вводили тваринам II і III груп внутрішньошлунково одноразово в середній ефективній дозі 8 мг/кг. IV група (контроль) отримувала відповідну кількість 1% крохмального гелю.

Моделлю ноціцептивної реакції служив тест електричного подразнення у щурів, який відтворювали в плексигласовій камері, використовуючи апарат ЕСЛ-2, який генерував електричні імпульси з частотою 100 Гц, тривалістю 5 мсек і затримкою 5 мсек. За поріг больової чутливості (ПБЧ) брали мінімальну напругу електричного струму, що викликав ноціцептивну реакцію у щурів, яку реєстрували по вокалізації, імерсії хвоста і (або) відривання лапок від струмопровідної поверхні дна камери [Гацура, 1974]. Знеболюючий ефект досліджуваних речовин визначали порівнюючи вихідний показник з таким через 1, 2, 4 і 6 годин після їх введення. Для оцінки центрального та периферичного компонентів антиноціцептивного ефекту використовували модель формалінового тесту [Torres-Lopez et al., 2002; Lee, Jeong, 2002]. Щурам субплантарно в праву нижню кінцівку вводили 0,1 мл 5% розчину формаліну. Ноціцептивна реакція у вигляді підняття і періодичного похитування лапи, а також її покусання або облизання складалась з двох стадій. Спостереження за тваринами проводилося впродовж 60 хвилин після введення формаліну. Зміни тривалості латентного періоду 2 фази і тривалості больової реакції в цій фазі свідчили про силу знеболюючої дії досліджуваних сполук.

Протизапальну дію оцінювали за антиексудативною активністю на моделях формалінового і карагенінового набряків у щурів і мишей, відповідно. Формаліновий набряк викликали, як описано вище, карагеніновий набряк відтворювали субплантарним введенням 0,1 мл 1% розчину карагеніну (Sigma, USA) в праву задню кінцівку тварини [Стефанов, 2001]. Досліджувані сполуки вводили внутрішньоочеревинно за 30 хвилин до субплантарного введення флогогену. Спостереження за розвитком простагландинового набряку у тварин проводили

через 3 години (пік розвитку) після введення карагеніну. Об'єм стоп вимірювали за допомогою механічного онкометра. Антиексудативну активність (АЕА) визначали за ступенем зменшення набряку в досліджуваних групах в порівнянні з контролем і виражали в відсотках, розраховуючи за формулою [Стефанов, 2001]:

$$\text{АЕА} = \frac{\Delta V_{\text{к}} - \Delta V_{\text{оп}}}{\Delta V_{\text{к}}} \times 100\%,$$

де АЕА - антиексудативна активність у %;

$\Delta V_{\text{к}}$  - середня різниця в обсязі між набряклою і здоровою лапами в групі контролю;

$\Delta V_{\text{оп}}$  - середня різниця в обсязі між набряклою і здоровою лапами в дослідній групі.

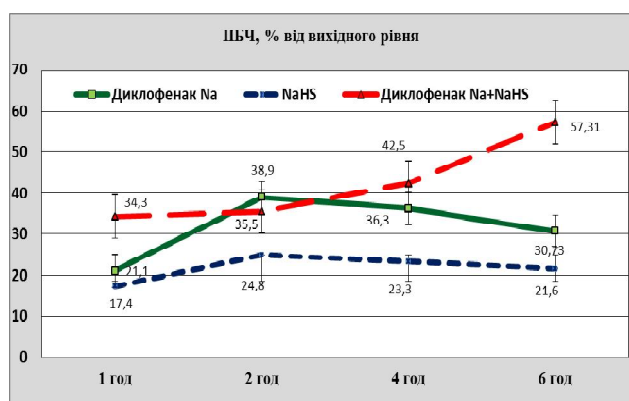
Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою варіаційної статистики з використанням пакету прикладних програм Statistica for Windows 6.0. Дані представлені у вигляді середнього значення і стандартного відхилення ( $M \pm SD$ ). Порівняння вибірок проводилося з використанням параметричного критерію Стьюдента, непараметричного U-критерію Манна-Уїтні і коефіцієнт Фішера. Для всіх видів аналізу статистичної значущості вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

## Результати. Обговорення

Нами було встановлено (рис. 1), що введення донора гідроген сульфід супроводжувалось помірно знеболюючою дією на моделі електричного подразнення, що проявлялося більш високими значеннями ПБЧ у щурів у порівнянні з такими до початку експерименту (на 17,4%; 24,8%; 23,3% і 21,6% на 1-ій, 2-ій, 4-ій і 6-ій годинах дослідження, відповідно). При цьому знеболююча дія диклофенаку натрію на тлі попереднього введення натрію гідроген сульфід було більш виразним, ніж монотерапія, особливо на пізніх етапах експерименту, і досягало статистично достовірних значень ( $p < 0,05$ ) на 4-ій і 6-ій годині після введення НПЗЗ (42,5% і 57,3% проти 36,5% і 30,7%, відповідно).

Додаткові дані про здатність натрію гідроген сульфід посилювати антиноціцептивний ефект диклофенаку натрію ми отримали на моделі формалінового тесту (табл. 1). Було виявлено незначний вплив натрію гідроген сульфід на першу фазу больової реакції, що характеризується центральними механізмами перцепції. В той же час, у другій фазі антиноціцептивна дія була більш вираженою, що проявлялося достовірним ( $p < 0,05$ ) подовженням латентного періоду болю (на 28,3%) і скорочення тривалості больової реакції (на 31,7%). Крім того, додаткове введення донора гідроген сульфід сприяло більш виразному антиноціцептивному ефекту диклофенаку натрію, про що свідчать достовірне збільшення (на 95,0%) тривалості латентного періоду II фази і зменшення (на 63,4%) в досліджуваній фазі, часу больової реакції в заданих умовах. Дані показники перевищували дані, які були отримані при монотерапії досліджуваним НПЗЗ на 29,3 і 40,2%, відповідно ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, ми встановили, що гідроген сульфід



**Рис. 1.** Зміни порогу больової чутливості при електрично-подразненні на тлі введення натрію гідроген сульфїду, диклофенаку натрію та їх комбінацій.

**Таблиця 1.** Вплив гідроген сульфїду на знеболюючу активність диклофенаку натрію на моделі формалінового тесту ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ ).

Препарат	I фаза (хв)		II фаза (хв)	
	Латентний період	Больова реакція	Латентний період	Больова реакція
Контроль	1,82±0,13	5,52±0,33	16,3±1,23	19,5±2,94
Диклофенак-натрій	2,27±0,33	5,06±0,55	24,6±1,37*	11,9±1,07*
NaHS	2,02±0,27	5,17±0,76	20,92±1,04**	13,3±2,68**
Диклофенак-натрій + NaHS	2,58±0,32*	4,90±0,69	31,8±2,99*#&	7,12±1,17**&

**Примітки:** \* - статистично вірогідні ( $p < 0,05$ ) відмінності щодо групи "контроль"; # - статистично вірогідні ( $p < 0,05$ ) відмінності щодо групи "диклофенак-натрій"; & - статистично вірогідні ( $p < 0,05$ ) відмінності щодо групи "NaHS".

**Таблиця 2.** Антиексудативна активність натрію гідроген сульфїду, диклофенаку натрію та їх комбінацій ( $n=10$ ).

№ групи	Умови досліджу	Антиексудативна активність, %	
		Карагеніновий набряк	Формаліновий набряк
I	NaHS	32,3%	21,7%
II	Диклофенак натрію	54,9%	38,2%
III	Диклофенак натрію + NaHS	81,9%	67,9%
IV	Контроль	0%	0%

притаманна помірна анальгетична активність, а також здатність посилювати і подовжувати знеболюючий ефект диклофенаку натрію, які були більш вираженими в умовах моделювання запального процесу. На нашу думку, це може бути пов'язано з вираженою антиоксидантною дією, та мембраностабілізуючою властивістю гідроген сульфїду [Волощук, Таран, 2011; Волощук, Таран, 2014; Jha et al. 2008], а також його антиексудативною дією. Не виключено, що зменшення запального набряку усуває механічне подразнення больових рецепторів у вогнищі запалення.

Для підтвердження цього припущення в наступній частині експерименту ми досліджували вплив гідроген сульфїду і його комбінації з диклофенаком натрію на виразність запального процесу. Результати досліджень

протизапальної дії досліджуваних сполук (табл. 2) показали, що донор  $H_2S$  володів протизапальною дією, про що свідчить зменшення ступеня набрякості кінцівки в групі мишей на моделі карагенінового набряку, в порівнянні з тваринами контрольної групи. Антиексудативна активність цієї сполуки складала 32,3%. Також нами відзначено, що введення гідроген сульфїду тваринам, які отримували в якості протизапального агента диклофенак, посилювало антифлогогенну дію останнього. Антиексудативна активність цієї комбінації склала 81,9%, тоді як монотерпія диклофенаком зменшувала ступінь карагенінового набряку лише на 54,9%. Аналогічні результати (наявність протинабрякової дії гідроген сульфїду та посилення антифлогогенної активності диклофенаку натрію) спостерігались на моделі формалінового набряку у щурів. Антинабрякова активність при сумісному застосуванні диклофенаку натрію і NaHS була в 1,7 разів більшою, ніж монотерапія диклофенаком (табл. 2).

Виявлена нами протизапальна та знеболююча дію гідроген сульфїду зіставляється з патогенезом протизапального ефекту досліджуваного НПЗЗ, що сприяє його синергічним впливом на протизапальний і антиноціцептивний ефекти диклофенаку натрію. Однак, не виключено існування також і інших механізмів терапевтичної дії цієї біологічно активної молекули на прояви запального процесу та перцепцію, зокрема, зменшення продукції прозапальних цитокінів, вмісту цАМФ, модуляції NMDA-рецепторів, впливу на потенціал-залежні K-АТФ канали і т. д. [Kimura, 2000; Jha et al., 2008; Kimura et al., 2010; Carballal et al., 2011].

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. Донор гідроген сульфїду при 5-ти денному введенні в умовно терапевтичній дозі (1/20 LD50) щурам викликає слабку анальгетичну дію у інтактних тварин і викликає статистично значимий антиноціцептивний ефект в умовах асептичного запалення (формалінового тесту).

2. На моделях запальних процесів (формалінового і карагенінового набряку) у мишей і щурів, відповідно, донор гідроген сульфїду викликав виразну антиексудативну дію.

3. Натрію гідроген сульфїд посилював антиноціцептивну дію диклофенаку натрію як на моделі електричного подразнення у щурів, так і в запальній фазі формалінового тесту. В той же час, сумісне введення NaHS істотно підсилювало протизапальний ефект диклофенаку натрію в умовах простагландин-індукованого запального процесу (карагенінового і формалінового набряків).

Подальші детальні дослідження впливу гідроген сульфїду на фармакодинаміку НПЗЗ, а також дослідження його впливу на прояви побічних реакцій препаратів цієї групи можуть бути перспективними напрямками підвищення ефективності та безпеки фармакотерапії болю та запалення.

## Список літератури

- Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / Гацура В. В. - М.: Медицина, 1974. - 142 с.
- Доклинические исследования лекарственных средств: метод. рекомендации; под ред. член-корр. АМН Украины А.В. Стефанова. - К.: ИД "Авиценна", 2001. - С. 292-301.
- Волощук Н. І. Вираженість гастротоксичної дії диклофенаку натрію на тлі дефіциту та надлишку гідроген сульфиду в експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Фармакологія та лікарська токсикологія. - 2014, № 4-5(40). - С. 17-24.
- Волощук Н. І. Гостра токсичність гідроген сульфиду та його вплив на протизапальний ефект диклофенаку в експерименті / Н. І. Волощук, І. В. Таран // Медична хімія. - 2011. - Т. 13, № 4 (49). - С. 88-91
- Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide / M. Lee, C. Schwab, S. Yu [et al.] // Neurobiology of Aging. - 2009. - Vol. 30. - P. 1523-1534.
- Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test / J. E. Torres-Lopez, M. I. Ortiz, G. Castaneda-Hernandez [et al.] // Life Sci. - 2002. - Vol. 70, № 14. - P. 1669-1676.
- Gastroprotective effect of NAHS against mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion injury in rat / S. A. Mard, N. Neisi, G. Solgi [et al.] // Digestive Diseases and Sciences. - 2012. - Vol. 57 (6). - P. 1496-1503.
- Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. / S. Jha, J. W. Calvert, M. R. Duranski [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. - 2008. - Vol. 295. - P. H801-H806.
- Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats / J. L. Wallace, M. Dickey, W. McKnight [et al.] // FASEB Journal. - 2007. - Vol. 21 (14). - P. 4070-4076.
- Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation / R. C. Zanardo, V. Brancialeone, E. Distrutti [et al.], // FASEB J. - 2006. - Vol. 20. - P. 2118-2120.
- Hydrogen sulphide - a novel mediator of inflammation? / L. Li, M. Bhatia, P. K. Moore // Curr. Opin. Pharmacol. - 2006. - Vol. 6. - № 2. - P. 125-129.
- Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor / Kimura H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2000. - Vol. 267. - P. 129-133.
- Kimura Y. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria / Y. Kimura, Y. Goto, H. Kimura // Antioxid. Redox Signal. - 2010. - Vol. 12, №1. - P. 1-13.
- Lee I.-O. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats / I.-O. Lee, Y.-S. Jeong // J. Korean Med. Scitnces. - 2002. - Vol. 17. - P. 81-85.
- Lowicka E. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacologicalreports. - 2007. - Vol. 59. - P. 4-24.
- Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest / S. Carballal, M. Trujillo, E. Cuevasanta [et al.] // Free Radical Biology & Medicine. - 2011. - Vol. 50. - P. 196-205.
- Synthesis and Biological Effects of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S): Development of H<sub>2</sub>S-Releasing Drugs as Pharmaceuticals / G. Caliendo, G. Cirino, V. Santagada [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. - 2010. - Vol. 53, № 17. - P. 6275-6286.

**Волощук Н.І., Таран І.В., Конюх С.А.**

### ВЛИЯНИЕ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА НА АНАЛГЕЗИРУЮЩИЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТЫ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**Резюме.** В экспериментах на лабораторных крысах и мышах определяли влияние гидроген сульфид на анальгезирующий и противовоспалительный эффекты диклофенака натрия. Антиноцицептивное и антифлогогенное действия донора гидроген сульфид (NaHS в дозе 1,5 мг/кг в/бр), диклофенака (8 мг/кг в/жел) и их комбинации изучали на моделях электрического раздражения, формалинового и каррагенинового отеков. Было установлено, что натрий гидроген сульфид уменьшал проявления воспалительного процесса и оказывал умеренное антиноцицептивное действие у интактных животных, а также выраженное анальгетический эффект при экспериментальном воспалительном процессе. Его введение усиливало фармакологические эффекты диклофенака натрия. Таким образом, способность гидроген сульфид моделировать фармакодинамику НПВС может быть перспективным направлением повышения эффективности и безопасности фармакотерапии препаратами этой группы.

**Ключевые слова:** гидроген сульфид, диклофенак натрия, формалиновый тест, каррагениновый отек, противовоспалительное, анальгезирующее действие.

**Voloshchuk N.I., Taran I.V., Konyuh S.A.**

### INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON THE ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF DICLOFENAC SODIUM IN EXPERIMENTS

**Summary.** In experiments on rats and mice the influence of H<sub>2</sub>S on the analgesic and anti-inflammatory effects of diclofenac sodium was determined. Antinociceptive and antiphlogogenic effects of the donor of H<sub>2</sub>S (1,5 mg/kg i.p.), diclofenac (8 mg/kg i.g) and their combinations were studied during electric pain stimulation, formalin test and carrageenan edemas. It was established that donor of H<sub>2</sub>S minimizes inflammatory process, causes moderate antinociceptive effect at intact animals, and more significant analgesic effect under experimental inflammatory processes. Its injection increased analgesic and anti-inflammatory actions of diclofenac sodium. Thus, ability of H<sub>2</sub>S to modulate the pharmacodynamics of NSAIDs may be promising ways of increasing the effectiveness and safety of pharmacotherapy with drugs of this group.

**Key words:** hydrogen sulfide, diclofenac sodium, formalin test, carrageenan edema, anti-inflammatory, analgesic effects.

Стаття надійшла до редакції 23.12.2014 р.

Волощук Наталія Іванівна - д. мед.н., професор, зав. кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 61-14-00

Таран Ілля Васильович - аспірант кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 61-14-00

Конюх Сергій Анатолійович - аспірант кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 61-14-00