

УДК 615.017:616.079; 615. 2/.3.001.37

Д. В. ДЕМ'ЯНЕНКО, Д. В. СЕМЕНІВ, Г. В. БЕЛІК, Ю. В. СТОЛЕТОВ, О. В. КУДІНА

Національний фармацевтичний університет

## МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ФРЕОНОВОГО ЕКСТРАКТУ СУЦВІТЬ ЛИПИ НА МОДЕЛІ АД'ЮВАНТНОГО АРТРИТУ У ЩУРІВ

*Проведено морфологічне дослідження фреонового екстракту суцвіть липи на моделі ад'ювантного артриту у щурів, за результатами якого встановлено здатність досліджуваного екстракту проявляти протизапальну дію.*

**Ключові слова:** фреоновий екстракт суцвіть липи; протизапальна дія; ад'ювантний артрит

### ВСТУП

**Актуальність теми.** Терапія захворювань опорно-рухового апарату, в тому числі і ревматоїдного артриту (РА), передбачає тривале застосування препаратів різних груп, базисними з яких є нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) та кортикостероїди [7]. Але ці препарати виявляють велику кількість побічних ефектів: виразкові ураження шлунка та 12-палої кишки, тонкого і товстого кишечника, що супроводжується колітами та ентеритами. НПЗЗ також можуть спричиняти синдром гострої ниркової недостатності [3]. Нове покоління НПЗЗ (коксиби) – селективні інгібітори циклооксигенази другого типу не чинять ульцерогенної дії, але виявляють цілу низку інших побічних ефектів, що значно обмежує їх застосування. Непередбачувані та/або небезпечні побічні ефекти багатьох НПЗЗ стали головною причиною до заборони вісімнадцяти препаратів за останні десять років [6].

Враховуючи вищевикладене, актуальною проблемою є пошук нових препаратів, в тому числі природного походження, переважно рослинних, що мають достатню протизапальну активність, є безпечними порівняно із синтетичними НПЗЗ та завдяки цьому придатні для довготривалої терапії РА або інших запальних процесів. З економічної точки зору важливим фактором також є доступність сировинної бази певних рослин.

В народній та офіційній медицині широко використовуються суцвіття різних видів липи завдяки їх різноманітній терапевтичній дії – седативній, відхаркувальній, потогінній, протизапальній та ін. [2, 5].

Враховуючи те, що суцвіття липи володіють протизапальними властивостями, було доцільним дослідити

протизапальні властивості в умовах модельної патології ревматоїдного артриту у щурів.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

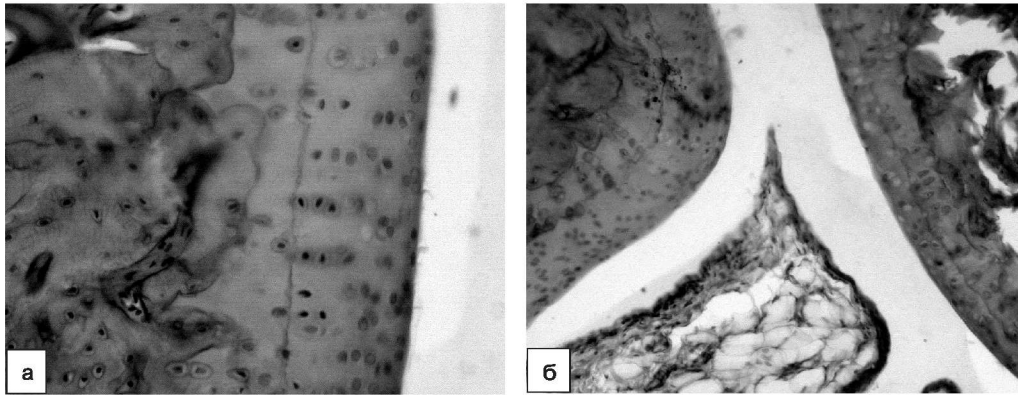
Протизапальні властивості ліпофільного та ліпофільно-гідрофільного комплексів, одержаних із суцвіть *Tilia cordata* шляхом послідовної переробки сировини різними зрідженими газами та їх сумішами, вивчали на моделі ревматоїдного артриту. Досліджували зрідженогазові екстракти суцвіть липи, які перспективно було б включати до складу пероральних лікарських форм. Для досліджень обрали активну субстанцію – дифторохлорометановий (фреоновий-22) ліпофільний екстракт із суцвіть липи, протизапальний ефект якого було встановлено при ректальному введенні щурам [1]. З метою перетворення екстракту на порошкоподібний стан для забезпечення зручності дозування та введення тваринам екстракт А був змішаний з інертним наповнювачем (лактозою) в розведенні 1:15 з утворенням порошкової суміші (зразок А або порошоканий екстракт суцвіть липи (ПЕСЛ)).

Протизапальні властивості зразка А досліджували на моделі ад'ювантного артриту (АА) на білих безпородних щурах масою 180-220 г. Для відтворення моделі АА використовували ад'ювант Фрейнда, який вводили тваринам одноразово субплантарно з розрахунку 0,1 мл на тварину [1]. ПЕСЛ вводили в лікувально-профілактичному режимі внутрішньошлунково 1 раз на добу з першого дня після ін'єкції ад'юванту протягом 22 днів в умовно-ефективній дозі 30 мг/кг, яка була визначена у попередніх дослідженнях. Препарат порівняння диклофенак натрію вводили в дозі ЕД<sub>50</sub> 8 мг/кг [1].

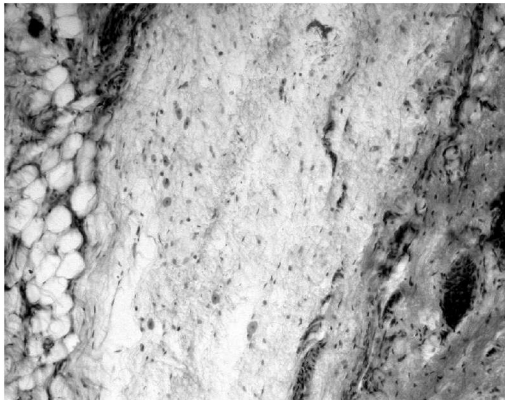
При проведенні морфологічних досліджень на моделі АА відсепаровані суглоби фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, після обробки у про-

© Колектив авторів, 2015



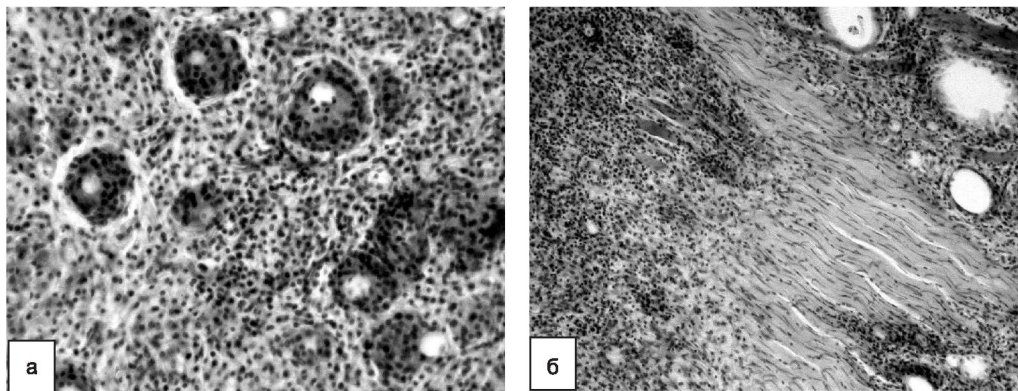


**Рис. 1.** Гіаліновий хрящ суглобової поверхні інтактного щура. Зональне розташування хрящових клітин чітко (а). Синовіальна оболонка нормальної будови (б). Гематоксилін і еозин. x 200.



**Рис. 2.** Періартікулярні тканини інтактного щура. Жирова, сполучна, м'язова тканина з незначним вмістом лейкоцитарних клітин. Гематоксилін і еозин. x 250.

точній воді тривалий час декальцинували в 6 % розчині азотної кислоти. Контроль тривалості витримки суглобів в декальцинуючому розчині проводили шляхом проколу кістки препарувальною голкою. Після проводки спиртами зростаючої концентрації тканини заливали в целлоїдин-парафін за стандартною методикою, з блоків виготовляли зрізи товщиною 6-8 мк, які фарбували гематоксиліном і еозином.



**Рис. 3.** Гомілковостопний суглоб щура після інокуляції ад'юванту Фрейнда. Масивна клітковина інфільтрація та гранулеми у періартікулярній тканині (а), x 250. Запальний інфільтрат, міоцитоліз, залишки змінених м'язових волокон (б). Гематоксилін і еозин, x 150.

Мікроскопічне дослідження проводили під мікроскопом «Бімам Р-12».

Для об'єктивізації отриманих даних проводили морфометричні вимірювання. За допомогою окуляр-мікрометра на мікропрепаратах визначали товщину хряща, яку вимірювали в 3-х точках – центральна частина голівки, верхній и нижній край. Товщину суглобного хряща виражали в умовних одиницях. Також підраховували щільність розміщення хондроцитів в умовній одиниці площі. Статистичну обробку отриманих цифрових даних проводили з застосуванням непараметричних методів (Mann-Whitney U Test) [4].

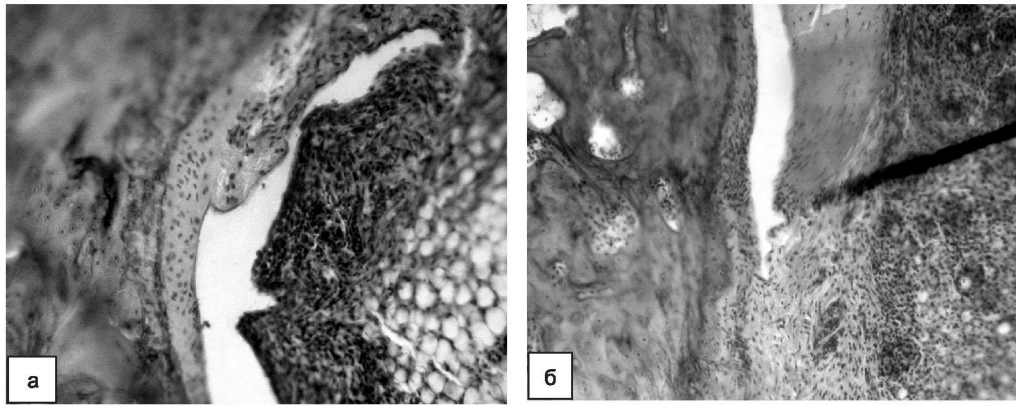
#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При проведенні морфологічних досліджень було встановлено, що суглобна поверхня кісток гомілкового суглоба інтактних щурів покрита гіаліновим хрящем, який має виражену зональну будову (рис. 1а, 1б).

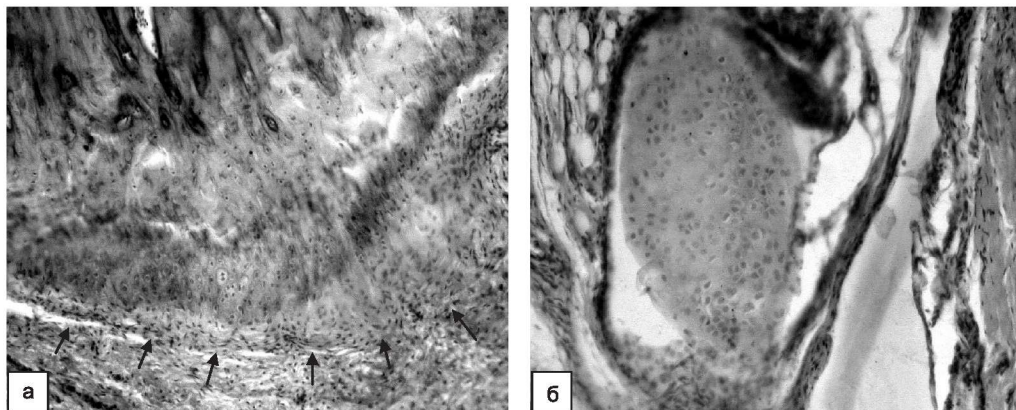
Біля суглоба сполучна тканина, в т.ч. сухожилля і підшкірно-жирова клітковина, мають типову для своєї локалізації будову, ознаки клітинної проліферації відсутні. Зустрічається помірна кількість клітин лімфоїдного і гістоціонарного ряду (рис. 2). М'язові волокна рівномірно забарвлені, смугастість в них добре виражена.

При гістологічному дослідженні гомілковостопних суглобів щурів після інокуляції ад'юванту у всіх





**Рис. 4.** Гомілкостопний суглоб щура після інюкаляції ад'юванту Фрейнда. Гіперплазований синовій (з права) формує панус і налізає на хрящ, інвазуючи його (а). Зростання хрящової поверхні з синовієм, вільний хрящ звужений (б). Гематоксилін і еозин, х 150.



**Рис. 5.** Гомілкостопний суглоб щура після інюкаляції ад'юванту Фрейнда. Повне зростання хрящової поверхні з синовієм (а), х 250. Хрящовий острів у сполучно-тканинній капсулі (б). Гематоксилін і еозин, х 150.

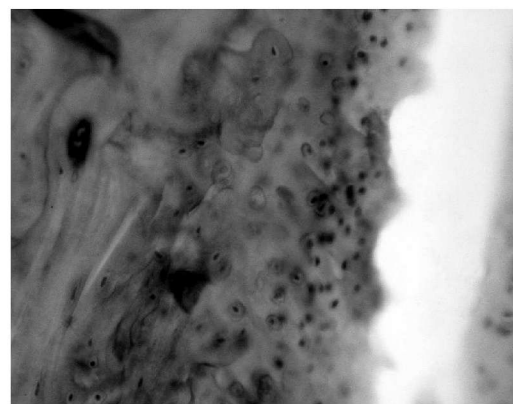
тварин знаходились морфологічні ознаки запальних, гіперпластичних і деструктивно-дистрофічних процесів.

У періартикулярних тканинах (прилежних сухожиллях, зв'язках та підшкірно-жировій клітковині) відмічається масивна клітковинна інфільтрація, зокрема лімфоїдно-нейтрофільна зі зкупченням плазматичів, часто зустрічаються васкуліти та гранулеми (рис. 3а). Зустрічаються вогнища міоцитолізу, м'язові волокна, що збереглися, набряклі, мають змінене забарвлення (рис. 3б). В судинах часто зустрічаються гнійні емболи та тромби.

Гіперплазовані оболонки з виявленими ознаками синовіту поводять себе дуже агресивно по відношенню до хрящової поверхні. Безпосередньо деструктивну дію чинить паннус-гіперплазована синовіальна оболонка, яка наростає на суглобну поверхню з бокових сторін та щільно зростається з нею. Місцями панус проникає у хрящ, замінюючи його з'єднувальною тканиною (рис. 4).

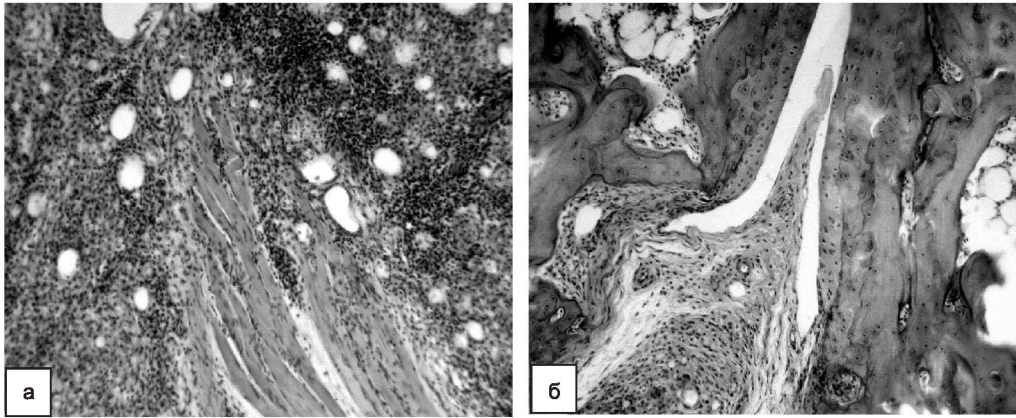
Хрящові поверхні деяких суглобів повністю інвазовані синовієм так, що важко розрізнити, де за-

кінчується хрящ і починається з'єднувальна тканина (рис. 5а). Рухливість таких суглобів дуже обмежена. Зустрічаються хрящі, які були з'єднані з усіх боків синовієм, являють собою хрящові островки, оточені з'єднувальною тканиною (рис. 5б).



**Рис. 6.** Гомілкостопний суглоб щура після інюкаляції ад'юванту Фрейнда. З'їдена хрящова поверхня. Гематоксилін і еозин, х 200.





**Рис. 7.** Гомілкостопний суглоб щура, диклофенак. Запальна реакція у періартикулярних тканинах, міоцитоліз (а). Синовій без крайової проліферації синовіоцитів, хрящ не змінений (б). Гематоксилін і еозин, х 150.



**Рис. 8.** Гомілкостопний суглоб щура, диклофенак, 8 мг/кг. Синовіальна оболонка, яка зростається з поверхнею хряща та інвазує ділянку суглобного хряща. Гематоксилін і еозин, х 200.

На тих поверхнях, де хрящ безпосередньо контактує з синовієм, він звужений (на 26 % у порівнянні з інтактом), зникає характерне зональне розташування хондроцитів (рис. 4), щільність розташування яких також знижена у порівнянні з інтактним конт-

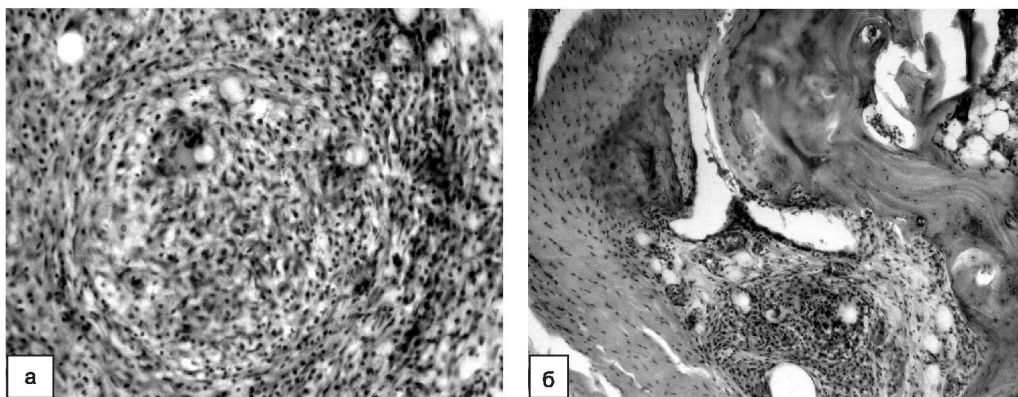
ролем. Зрідка відмічається відсутність чіткості меж та нерівність контурів хрящової поверхні (рис. 6).

У тому ж місці, де хрящ був вільним і не торкався гіперплазованої синовіальної оболонки, він зберіг відносно нормальну будову.

Застосування диклофенаку у лікувальних цілях не знижує виразності запально-проліферативних процесів в періартикулярних тканинах. М'якотканинні структури густо інфільтровані лейкоцитами, містять гранулеми, м'язи місцями візовані (рис. 7а). Ознаки синовіту відмічаються, але синовіальні оболонки дещо спокійніші, ніж у групі позитивного контролю. У випадку, коли проліферативні процеси локалізовані тільки в субсиновіальному шарі, а крайові синовіоцити лежать у 1-2 шари, синовій лежить у суглобовому просторі, не торкаючись хрящової поверхні, а хрящ при цьому не змінений (рис. 7б).

У випадку вираженого синовіту оболонка формує панус, який щільно зростається з суглобним хрящем (рис. 8). Суглобні поверхні з повністю інвазованим хрящем не зустрічались.

Морфометричні показники мало відрізняються від показників контрольної патології, щільність розташування хондроцитів підвищується (таблиця).



**Рис. 9.** Гомілкостопний суглоб щура, ПЕСЛ. Гігантські клітини чужорідних тіл та гранулеми в періартикулярній тканині (а), х 250. Синовій з ознаками синовіоциту наповзає на хрящ, зональне розташування клітин відсутнє (б). Гематоксилін і еозин, х 150.



Таблиця

**МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ СУГЛОБНОГО ХРЯЩА ЩУРІВ**

Група тварин	Товщина хряща	Клітинна щільність на ум.од. площі
Інтактний контроль	11,48 ± 0,29	27,15 ± 0,94
Контрольна патологія	8,51 ± 0,52*	23,33 ± 1,09*
Диклофенак натрію	8,14 ± 0,72*	24,66 ± 1,70
Екстракт липи	8,94 ± 0,28*	27,15 ± 1,24**

Примітки:

1) \* – достовірно ( $p \leq 0,5$ ) відносно інтактного контролю;2) \*\* – достовірно ( $p \leq 0,5$ ) відносно контрольної патології.

При застосуванні ПЕСЛ морфологія періартикулярних тканин не відрізняється від такої у щурів з групи позитивного контролю (рис. 9а). Виявлена гігантклітинна гранулярна реакція.

Синовій з проліферуючими крайовими синовіоцитами, розширеними та кровонаповненими судинами, запальними субсиновіальними шарами підпозає до суглобних хрящів. Характерна для гіалінового хряща зональність розташування клітин часто порушена (рис. 9б). Проте, повного зростання синовію з хрящовою поверхнею та руйнування останньої не відмічається. Морфометричні показники краще, ніж у групі контрольної патології, а щільність розташування хондроцитів досягає інтактних показників (таблиця).

**ВИСНОВКИ**

1. Багаторазове введення ад'юванту Фрейнда призводить до розвитку у щурів морфологічних ознак деформуючого артриту (проліферативний синовіт, формування пануса, який знищує хрящ, дегенеративно-дистрофічні зміни хрящової тканини). Головною ознакою при цьому є масивна запальна інфільтрація у періартикулярних тканинах.
2. Під впливом препарату порівняння диклофенаку виявлений певний нормалізуючий вплив на стан синовіальних оболонок. Виразність синовіту нижча, у результаті чого не було виявлено

повністю інвазованих хрящових поверхонь. Проте покращення морфометричних показників у порівнянні з контрольною патологією не спостерігалось. Зниження виразності запально-проліферативних процесів в періартикулярних тканинах також не відбувалось.

3. Введення ПЕСЛ нормалізує стан періартикулярної тканини, морфологія якої не відрізняється від показників інтактного контролю. Виразність синовію значно нижча у порівнянні з контрольною патологією, руйнування хрящової поверхні не відмічалось. Під впливом ПЕСЛ відбулася нормалізація і морфометричного показника (клітинна щільність).

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – С. 352-360.
2. Куцын Р. В. Иммунокорригирующие и противовоспалительные свойства биологически активных веществ некоторых растений Сибири / Р. В. Куцын, О. Г. Рыбальчук. – Томск: Кедр, 2004. – 214 с.
3. Мамчур В. Современные представления о механизмах терапевтического и побочного действия НПВС / [В. Мамчур, Е. Подплетняя, О. Макаренко и др.] // Вісник фармакол. та фармації. – 2005. – № 4. – С. 3-17.
4. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – 3-е изд. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
5. Соколов С. Я. Фитотерапия и фитофармакология: [руководство для врачей]. – М.: Мед. информ. агентство, 2000. – 976 с.
6. Чичасова Н. В. Основные вопросы применения НПВП, волнующие практических врачей / Н. В. Чичасова // Рус. мед. журн. – 2006. – № 2. – С. 215-217.
7. Fleischman R. M. Is there a need for new therapies for rheumatoid arthritis / R. M. Fleischman // J. Rheumatol. – 2005. – Vol. 32, Suppl. 73. – P. 3-7.

**УДК 615.017:616.079; 615. 2/.3.001.37****Д. В. Демьяненко, Д. В. Семенив, Г. В. Белик, Ю. В. Столетов, О. В. Кудина****МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФРЕОНОВОГО ЭКСТРАКТА СОЦВЕТИЙ ЛИПЫ НА МОДЕЛИ АДЪЮВАНТНОГО АРТРИТА У КРЫС**

Проведено морфологическое исследование фреонового экстракта соцветий липы на модели адъювантного артрита у крыс, по результатам которого установлена способность исследуемого экстракта проявлять противовоспалительное действие.

**Ключевые слова:** фреоновый экстракт соцветий липы; противовоспалительное действие; адъювантный артрит

**UDC 615.017:616.079; 615. 2/.3.001.37****D. V. Demyanenko, D. V. Semenov, G. V. Belik, Yu. V. Stoletov, O. V. Kudina****MORPHOLOGICAL STUDY OF FREON EXTRACT FROM LIME INFLORESCENCES ON THE MODEL OF ADJUVANT ARTHRITIS IN RATS**

A morphological study of freon extract from lime inflorescences on the model of adjuvant arthritis in rats has been carried out. It was found that this extract showed anti-inflammatory action.

**Key words:** freon extract from lime inflorescences; anti-inflammatory action; adjuvant arthritis

*Адреса для листування:*

61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.

Тел. (057) 706-30-69.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції

15.06.2015 р.