

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОЯЗВЕННОЙ АКТИВНОСТИ ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДИНИТРАТА 2-ФЕНИЛ-9-ДИЭТИЛАМИНОЭТИЛИМИДАЗО[1,2-А]БЕНЗИМИДАЗОЛА НА МОДЕЛИ ЭТАНОЛ-ПРЕДНИЗОЛОНОВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

¹Черников М.В., ²Абисалова И.Л., ²Хромова Н.А.

¹ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: m.v.chernikov@pmedpharm.ru;

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск, e-mail: khromovanatasha1994@gmail.com

По данным мировой статистики за последние 10 лет у 7–14 % взрослого населения экономически развитых стран диагностируется язвенная болезнь желудка. Этот процент ниже, чем за предыдущее десятилетие, что связано с улучшением методов диагностики и расширением арсенала лекарственных средств, применяемых для терапии язвенной болезни. Однако поиск новых веществ с высокой фармакологической эффективностью, воздействующих на разные звенья патогенетических механизмов ulcerogenesis, остается актуальным вопросом. Изучено влияние ГЛФ РУ-64 содержащей в качестве активного вещества субстанцию динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола на развитие эрозивно-язвенных повреждений слизистой желудка при однократном введении преднизолона в дозе 20 мг/кг, растворенного в 80 % этаноле. Данная модель со 100 % статистической вероятностью позволяет воссоздать эрозивно-язвенное повреждение слизистой желудка. В качестве препаратов сравнения использовались широко применяемые в терапии язвенной болезни препараты ранитидин и омепразол. Исследуемая ГЛФ РУ-64 проявляет выраженный противовоспалительный эффект при моделировании повреждения слизистой желудка введением преднизолона в виде спиртового раствора на 80 % этиловом спирте по макро- и микроскопическим показателям. У экспериментальных животных зафиксировано снижение степени и площади повреждения слизистой оболочки желудка, снижение интенсивности кровоизлияний, деструкции кровеносных сосудов и степени некроза. Полученные эффекты сопоставимы с действием препаратов сравнения ранитидина и омепразола. По показателю глубины повреждения внутренней оболочки желудка ГЛФ РУ-64 достоверно превосходит действие препаратов сравнения.

Ключевые слова: язвенная болезнь, гастропротекторы, ulcerogenesis, этанол-преднизолоновое повреждение, динитрат 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола

STUDY OF THE PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF THE ANTI-ULCER ACTIVITY OF THE FINISHED DOSAGE FORM OF 2-PHENYL-9-DIETHYLAMINOETHYLYMIDAZO [1,2-A] BENZIMIDAZOLE DINITRATE IN THE MODEL OF ETHANOL-PREDNISOLINE DAMAGE OF THE GASTRIC MUCOSA

¹Chernikov M.V., ²Abisalova I.L., ²Khromova N.A.

¹Volgograd State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Volgograd, e-mail: m.v.chernikov@pmedpharm.ru;

²Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Pyatigorsk, e-mail: khromovanatasha1994@gmail.com

According to world statistics over the past 10 years, 7–14 % of the adult population of economically developed countries is diagnosed with gastric ulcer. This percentage is lower than in the previous decade, which is associated with their improvement of diagnostic methods and the expansion of the arsenal of drugs used for the treatment of gastric ulcer. Though, the search for new substances with high pharmacological efficacy that affect different parts of the pathogenetic mechanisms of ulcerogenesis remains an urgent issue. The effect of FDF RU-64 containing the substance of 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo [1,2-a] benzimidazole dinitrate as an active substance on the development of erosive and ulcerative lesions of gastric mucosa with a single administration of prednisolone at a dose of 20 mg/kg dissolved in 80 % ethanol was studied. This model with 100 % statistical probability allows you to recreate erosive and ulcerative damage to the gastric mucosa. Ranitidine and omeprazole widely used in the treatment of gastric ulcer were applied as comparison medicines. The investigated FDF RU-64 shows a pronounced antiulcer effect when modeling damage to the gastric mucosa by the introduction of prednisolone in the form of

an alcohol solution in 80 % ethanol in terms of macro- and microscopic parameters. In experimental animals, a decrease in the degree and area of damage to the gastric mucosa, a decrease in the intensity of hemorrhages, destruction of blood vessels and the degree of necrosis were registered. The effects obtained are comparable to the effect of the comparison drugs ranitidine and omeprazole. In terms of the depth of damage to the inner lining of the stomach, FDF RU-64 significantly exceeded the effect of comparison drugs.

Keywords: peptic ulcer, gastroprotectors, ulcerogenesis, ethanol-prednisolone damage, 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-a]benzimidazoledinitrate

Исследование выполнялось в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Государственный контракт от 14.11.2017 № 14.N08.11.1042.

Патофизиология формирования язвенной болезни желудка четко не определена, однако патогенетические теории развития предъязвенного фона, такие как кислотно-пептическая, нестероидная, хеликобактерная, гастрическая, стрессовая, общепризнанны [1–3]. Например, увеличение секреции глюкокортикоидов приводит к дистрофическим изменениям поверхностного эпителия слизистой оболочки, ослаблению секреции защитных мукополисахаридов, нарушению синтеза рибонуклеиновой кислоты, усилению процессов распада, тормозящих регенерацию. Определенный вклад в развитие дистрофических изменений вносят сосудистые нарушения, обусловленные набуханием эндотелия, мукоидным отеком, изменением эластических и аргирофильных волокон стенок сосудов. Все перечисленные механизмы провоцируют ульцерогенез. Для экспериментального моделирования глюкокортикоидных язвенных повреждений предложена методика комбинирования глюкокортикоида преднизолон с 80 % раствором этилового спирта [4]. Этанол повреждает эндотелий сосудов, что приводит к снижению кровотока и развитию ишемии, ингибирует антиоксидантную систему, что способствует образованию свободных радикалов [5–7]. Этанол-преднизолоновая модель позволяет со 100 % статистической вероятностью воссоздать эрозивно-язвенное повреждение слизистой желудка [8]. Цели исследования – изучение противоязвенной активности готовой лекарственной формы на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола при введении преднизолон в виде спиртового раствора на 80 % этиловом спирте с использованием в качестве препаратов сравнения ранитидина и омепразола.

Материалы и методы исследования

В эксперименте использовалась готовая лекарственная форма динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола (лабораторный шифр ГЛФ РУ-64, таблетки 60 мг). Таблетки светло-зеленого цвета без запаха, двояковыпуклые, серия № 001 от 01.03.2018 [9]. Препараты сравнения: ранитидин (Хемофарм А.Д., Сербия, серия М703084), омепразол (субстанция омепразола Sigma Aldrich, США). Эксперименты выполнены на крысах-самцах

линии Wistar (возраст 10–12 недель) массой 180–250 г. Животные содержались в соответствии с требованиями постановления Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Язвенное поражение вызывалось введением преднизолона (Гедеон Рихтер, Румыния, серия № 960920), растворенного в спирте из расчета 20 мг/кг, и 80 % этилового спирта (необходимую концентрацию получали путем разведения спирта этилового 96 % водой дистиллированной с использованием ареометра лабораторного) в дозе 0,6 мл на 100 г массы тела животных. Доза для ГЛФ РУ-64 равна ED50, рассчитана на основании данных, полученных на модели этанол-преднизолонового повреждения для фармацевтической субстанции (5 мг/кг). Для ранитидина (28 мг/кг) и омепразола (3,7 мг/кг) дозы рассчитаны исходя из суточной дозы для человека с использованием соответствующих коэффициентов пересчета (для человека – 39, для крыс – 6). За 24 ч до моделирования патологии животные подвергались пищевой депривации со свободным доступом к воде. Исследуемая ГЛФ РУ-64 и препараты сравнения вводились профилактически за 1 час до введения комбинации этанола и преднизолона. Эвтаназию животных проводили через 12 ч после введения комбинации этанола и преднизолона. Исследования выполнялись в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» [10]. После эвтаназии из брюшной полости экспериментальных животных извлекали желудки и промывали их 0,9 % раствором хлорида натрия. Оценку повреждения осуществляли макроскопическим способом, подсчитывали площадь язвенного поражения и проводили макрофотографию. Для микроскопического изучения желудки фиксировались в 10 %-ном нейтральном формалине и заливались парафином. Гистологические срезы изготавливались на санном микротоме. Оценка глубины повреждения слизистой оболочки желудка проводилась с использованием инструментов программного обеспечения "Leica Application Suite".

Для анализа глубины язвенной альтерации использовали систему баллов [11]. В каждой группе высчитывали сумму баллов, после чего рассчитывали среднюю арифметическую величину, которая отображает среднюю степень изъязвления в группе (СИ). СИ – степень изъязвления, является средним арифметическим значением всех рассчитанных баллов. Также проводился расчет индекса изъязвления. В индексе изъязвления (ИИ) отражены как процент частоты животных с язвами, так и степень дистрофических нарушений в желудке. Рассчитывается как произведение степени изъязвления на % животных с язвами, деленное на 100.

Обработку полученных данных выполняли с использованием вариационной статистики: нормальность распределения вычисляли, используя критерий Колмогорова – Смирнова, рассчитывали среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего значения (m), для параметрического распределения применяли критерий Стьюдента, а для непараметрического распределения использовали U-критерий Манна – Уитни.

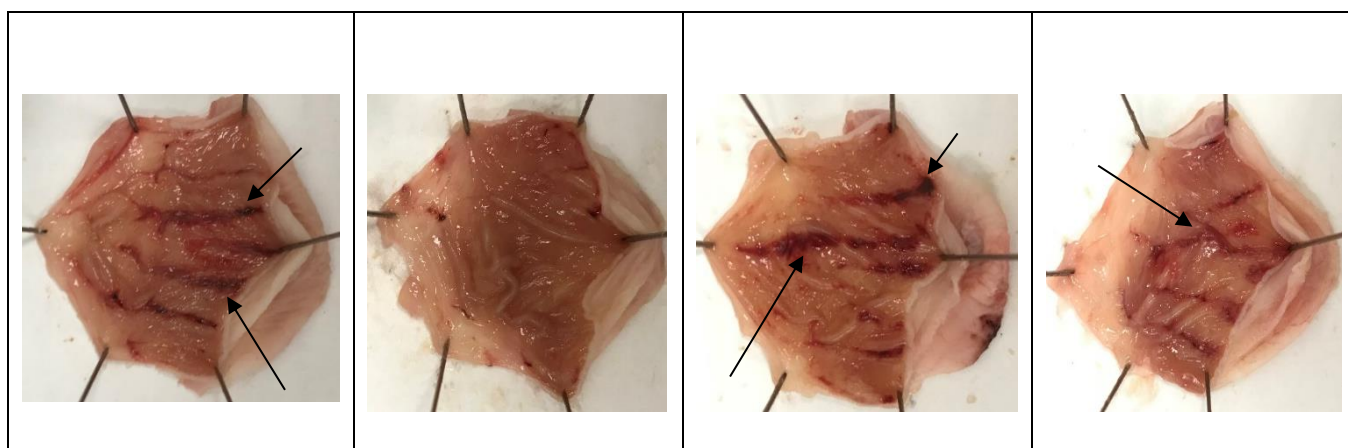
Таблица 1

Распределение экспериментальных животных по группам

№ группы	Вводимые вещества, доза
Группа (контрольные; n= 10♂)	преднизолон 20 мг/кг + этанол 80 %
Группа (опытные; n = 10♂)	преднизолон 20 мг/кг + этанол 80 % + ГЛФ РУ-64 – 5 мг/кг
Группа (сравнение 1; n = 10♂)	преднизолон 20 мг/кг + этанол 80 % + Ранитидин – 28 мг/кг
Группа (сравнение 2; n = 10♂)	преднизолон 20 мг/кг + этанол 80 % + Омепразол – 3,7 мг/кг

Результаты исследования и их обсуждение

Эксперименты показали, что интрагастральное введение этанол-преднизолоновой смеси вызывает эрозивно-язвенное повреждение слизистой желудка. На рис. 1 представлена картина наиболее характерных макроскопических изменений слизистой желудка в контрольной группе и в группах, получавших ГЛФ РУ-64, препараты сравнения ранитидина и омепразола.



Группа № 1	Группа № 2	Группа № 3	Группа № 4
Преднизолон 20 мг/кг + Этанол 80 %	Преднизолон 20 мг/кг + Этанол 80 % + ГЛФ РУ-64 5 мг/кг	Преднизолон 20 мг/кг + Этанол 80 % + Ранитидин 28 мг/кг	Преднизолон 20 мг/кг + Этанол 80 % + Омепразол 3,7 мг/кг

Рис. 1. Макрофотографии слизистой желудка исследуемых групп при повреждении этанол-преднизолоновой смесью

Изучаемая ГЛФ РУ-64 в дозе 5 мг/кг на 40 % снижала количество животных с поражением слизистой желудка, а площадь повреждения слизистой уменьшалась на 81,6 % по сравнению с контрольной группой. В 3-й группе, получавшей ранитидин в дозе 28 мг/кг, количество животных с поражением слизистой желудка уменьшалось на 20 %, а площадь повреждения на 66 % по сравнению со значениями контрольной группы. В 4-й группе, получавшей омепразол в дозе 3,7 мг/кг, количество животных с поражением слизистой желудка, так же как и в 3-й группе, уменьшалось на 20 %, а площадь повреждения на 63 % по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что достоверных отличий между эффектами изучаемой ГЛФ РУ-64 и препаратами сравнения по показателю абсолютных значений площади поврежденной слизистой не зафиксировано. В то же время расчет индекса изъязвления, который указывает не только на площадь поражения, но и на частоту эрозивно-язвенных изменений у животных, показал, что в группе ГЛФ РУ-64 индекс изъязвления снижался на 77 %, в группе препарата сравнения ранитидина на 47 %, в группе омепразола на 49 % (табл. 2).

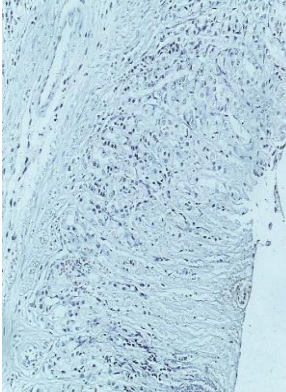
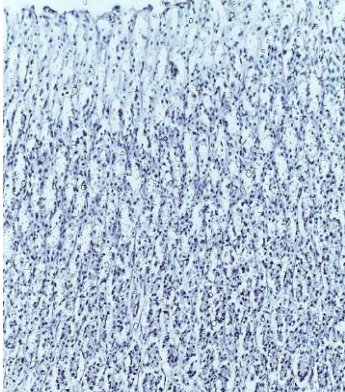

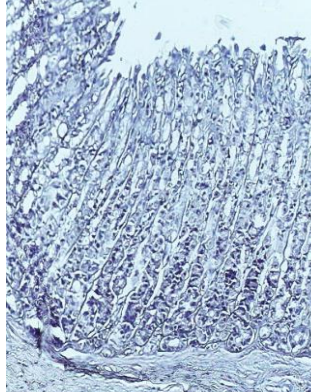
Таблица 2

Макроскопические данные влияния ГЛФ РУ-64 на слизистую оболочку желудка при введении преднизолона 20 мг/кг в сочетании с этанолом (80 %), $M \pm m$

Группа (вещество)	Доза	Площадь повреждения (мм ² /особь)	% особей с поражением слизистой	Степень изъязвления (СИ)	Индекс изъязвления (ИИ)	% снижения ИИ
Этанол + преднизолон	20 мг/кг в 80 % спирте	64,09±14,61	100	3,90±0,10	3,90	–
ГЛФ РУ-64	5 мг/кг					

Этанол + преднизолон	20 мг/кг в 80 % спирте	11,82±7,07*	60	1,50±0,47*	0,90	77
Ранитидин	28 мг/кг	21,75±4,76*	80	2,60±0,48*	2,08	47
Этанол + преднизолон	20 мг/кг в 80 % спирте					
Омепразол	3,7 мг/кг	23,73±5,55*	80	2,50±0,48*	2,0	49
Этанол + преднизолон	20 мг/кг в 80 % спирте					
Примечание: * – достоверность относительно контроля P < 0,05.						

Микроскопическое изучение продемонстрировало, что сочетание преднизолона с этанолом приводит к процессу формирования поверхностных дефектов слизистой оболочки с лейкоцитарной инфильтрацией, деструкцией желез, кровоизлияниями и некрозом тканей. Микрофотографии наиболее типичных изменений и их описание представлены на рис. 2.

			
Группа № 1 Преднизолон 20 мг/кг + Этанол 80 %	Группа № 2 Преднизолон 20 мг/кг + Этанол 80 % + ГЛФ РУ-64 5 мг/кг	Группа № 3 Преднизолон 20 мг/кг + Этанол 80 % + Ранитидин 28 мг/кг	Группа № 4 Преднизолон 20 мг/кг + Этанол 80 % + Омепразол 3,7 мг/кг

Дефект слизистой до подслизистого слоя с выраженным отеком. Отмечается обширная деструкция желез с участками гомогенных некротических масс	Общий план строения слизистой сохранен, отмечается поверхностный отек и десквамация эпителия	Поверхностный дефект слизистой с периферическими мелкоочаговыми кровоизлияниями, полнокровием сосудов подслизистой	Отмечался выраженный отек слизистой с расширением просвета желез и пространств между ними. Также отмечались участки поверхностной десквамации эпителия
--	--	--	--

Рис. 2. Результаты патоморфологической оценки влияния ГЛФ РУ-64 на процесс формирования язвенных повреждений слизистой оболочки желудка при введении преднизолона 20 мг/кг в сочетании с этанолом (80 %)

Морфометрические измерения глубины повреждения показали, что деструктивные процессы при профилактическом введении ГЛФ РУ-64 по показателю глубины формируемых дефектов были достоверно менее выражены, по сравнению с данными групп, получавших препараты сравнения ранитидин и омепразол. Средний процент снижения глубины повреждения при введении ГЛФ РУ-64 в дозе 5 мг/кг составил 78 %. Ранитидин и омепразол также достоверно относительно контроля снижали глубину повреждения слизистой оболочки – на 54 и 53 % соответственно. По результатам гистологических исследований деструктивные процессы в слизистых оболочках были выявлены только у 30 % животных, получавших ГЛФ РУ-64 (табл. 3).

Таблица 3

Показатели морфометрической оценки влияния ГЛФ РУ-64 на создание язвенной альтерации слизистой оболочки желудка при использовании преднизолона 20 мг/кг в сочетании с этанолом (80 %) (n = 50)

Группа	Глубина повреждения, мкм	Средний % снижения глубины повреждения
Контроль	141,95± 16,8	
Преднизолон 20 мг/кг + этанол 80 %		–
	30,48±	

Преднизолон 20 мг/кг + этанол 80 % + ГЛФ РУ-64 5 мг/кг	6,90* $\&\#$	-78
Преднизолон 20 мг/кг + этанол 80 % + ранитидин 28 мг/кг	64,13 \pm 7,20*	-54
Преднизолон 20 мг/кг + этанол 80 % + омепразол 3,7 мг/кг	65,23 \pm 10,54*	-53
Примечание. * – достоверность относительно контроля $P < 0,05$, $\&$ – достоверность относительно группы получавших ранитидин в эквивалентной дозе $P < 0,05$, $\#$ – достоверность относительно группы получавших омепразол в том же уровне дозы $P < 0,05$. N = 50, так как для исследования использовалось 10 животных в группе, производили по 5 измерений глубины на участках.		

Заключение

Исследуемая готовая лекарственная форма на основе динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола проявляет выраженное антиульцерогенное действие при моделировании преднизолон-этанолового повреждения слизистой желудка по показателям макро- и микроскопического исследования. У экспериментальных животных зафиксировано снижение степени и площади повреждения слизистой оболочки желудка, снижение интенсивности кровоизлияний, деструкции кровеносных сосудов и степени некроза. Полученные эффекты сопоставимы с действием препаратов сравнения ранитидина и омепразола. По показателю глубины повреждения слизистой оболочки желудка ГЛФ РУ-64 достоверно превосходила действие препаратов сравнения. Данные результаты сопоставимы с полученными ранее результатами по гастропротекторной активности фармацевтической субстанции динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола. Таким образом, разработанная на основе фармацевтической субстанции динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола ГЛФ РУ-64 обеспечивает гастропротекторное и антиульцерогенное действие при моделировании преднизол-этанолового повреждения, что позволяет считать дальнейшее изучение данной лекарственной формы перспективным с целью пополнения арсенала гастропротекторных средств на фармацевтическом рынке.

Список литературы

1. Narayanan M., Reddy K.M., Marsicano E. Peptic Ulcer Disease and Helicobacter pylori infection // Missouri medicine. 2018. Vol. 115, № 3. P. 214–218.
2. Бородач А.В. Современная концепция язвенной болезни: насколько она обоснована // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2013. № 10. С. 38–42.
3. Хромова Н.А., Черников М.В., Оганова М.А. Противоязвенная активность динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола при НПВС-индуцированных (индометациновых) повреждениях слизистой оболочки желудка лабораторных животных // Естественные науки и медицина: теория и практика: сборник статей по материалам XIII–XV международной научно-практической конференции (Новосибирск, 14 октября 2019 г.). Т. 8–10 (9). Новосибирск: Ассоциация научных сотрудников «Сибирская академическая книга», 2019. С. 40–46.
4. Багинская А.И., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Воскобойникова И.В., Колхир В.К. Экспериментальное моделирование в гастроэнтерологии. Практические рекомендации. Часть II. Экспериментальные модели «острых» язв желудка // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. № 3. С. 32–40.
5. Simões S., Lopes R., Campos M.C.D., Marruz M.J., da Cruz M.E.M., Corvo L. Animal models of acute gastric mucosal injury: Macroscopic and microscopic evaluation // Animal Models and Experimental Medicine. 2019. № 2. P. 121–126.
6. Das D., Bandyopadhyay D., Bhattacharjee M., Banerjee R.K. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration // Free Radical Biology & Medicine. 1997. Vol. 23, № 1. P. 8–18.
7. Прокопьева В.Д., Ветлугина Т.П., Ярыгина Е.Г., Мандель А.И. Оценка периферических маркеров окислительного стресса у больных алкоголизмом // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2018. № 9. С. 69–73.
8. Chernikov M.V., Ovanova M.A., Kalashnikova S.A., Khromova N.A. Antiulcer activity of 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-a]benzimidazoledinitrate in ethanol-prednisolone damage to gastric mucosa // Pharmacy & Pharmacology. 2019. Vol. 7, № 6. P. 339–345.
9. Петров В.И., Спасов А.А., Черников М.В., Степанова Э.Ф., Шевченко А.М., Оганова М.А., Морковник А.С. Фармацевтическая композиция, обладающая противоязвенной активностью, и способ ее получения // Патент № 2736184. Патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 2020. Бюл. № 32.
10. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1.04.2016 г. № 199н «Об утверждении "Правил надлежащей лабораторной практики"» (Зарегистрировано в

Минюсте РФ 15 августа 2016 г. № 43232) // Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти. № 37, 12 сентября 2016 г.

11. Adinortey M.B., Ansah C., Galyuon I., Nyarko A. In vivo models used for evaluation of potential antigastroduodenalulcer // *Ulcers*. 2013. Vol. 2013. P. 1–12.