

Д-Р ПЛАМЕН КРАСИМИРОВ КРЪСТЕВ

**ЕФЕКТИ НА U-74389G В ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ НА БЕЛОДРОБНА ТОКСИЧНОСТ И
КОЛИТ ПРИ ПЛЪХОВЕ**

АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“

ДОКТОРСКА ПРОГРАМА „ФАРМАКОЛОГИЯ (ВКЛ. ФАРМАКОКИНЕТИКА И ХИМИОТЕРАПИЯ)“,
ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ „7.1. МЕДИЦИНА“,
НАПРАВЛЕНИЕ „7. ЗДРАВЕОПАЗВАНЕ И СПОРТ“

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ: ПРОФ. Д-Р ГАЛЯ ЦВЕТАНОВА СТАВРЕВА-МАРИНОВА, Д.М.
ДОЦ. Д-Р ВИОЛЕТА ЙОРДАНОВА ДАНЧЕВА, Д.М.

Плевен, 2026

Списък на членовете на Научното жури

във връзка със защита на дисертационен труд от д-р Пламен Красимиров Кръстев, докторант в самостоятелна форма на обучение, по научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“, професионално направление „7.1. Медицина“, област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт“

Вътрешни членове за МУ-Плевен

1. Доц д-р Диана Илиева Пендичева-Духленска, д.м., катедра „Фармакология и токсикология“
2. Проф. д-р Анелия Александрова Димитрова, д.м., катедра „Физиология и патофизиология“
3. Доц. д-р Армине Вардани Григорян, д.м. катедра „Физиология и патофизиология“
4. Доц. д-р Евгения Иванова Бързашка-Христова, д.м., катедра „Фармакология и токсикология“, резервен член.

Външни членове за МУ-Плевен

1. Проф. д-р Иванка Илиева Костадинова, д.м., пенсионер от МУ-Пловдив
2. Проф. д-р Людмил Пейчев Пейчев, д.м., м.з.м., катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Фармацевтичен факултет, Медицински университет – Пловдив
3. Проф. д-р Стефка Вълчева Кузманова, д.м.н., катедра „Фармакология и клинична фармакология и терапия“, Медицински факултет, Медицински университет – Варна, резервен член.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на _____ от _____ часа в зала
“Амбоаз Паре“ на МУ-Плевен.

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на МУ – Плевен.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения – 4 стр.

Въведение – 7 стр.

ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ

1. Цел – 8 стр.
2. Задачи – 8 стр.
3. Материали и методични подходи – 9 стр.
 - 3.1. Експериментални животни – 9 стр.
 - 3.2. Методични подходи при изследване на ефекта на U-74389G при експериментален модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност – 9 стр.
 - 3.3. Методични подходи при изследване на ефекта на U-74389G при експериментален модел на колит – 12 стр.

РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО И ОБСЪЖДАНЕ

1. Ефект на U-74389G при експериментален модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност (АИБТ) – 14 стр.
 - 1.1. Избор на подходящ модел на амиодарон индуцирана белодробна токсичност – 14 стр.
 - 1.2. Ефектите на U-74389G върху маркери за възпаление и цитотоксичност в бронхо-алвеоларна лаважна течност (БАЛТ) при амиодарон-индуцирана белодробна токсичност – 16 стр.
 - 1.3. Ефекти на U-74389G върху маркери на антиоксидантната защитна система, липидна пероксидация и белодробна фиброза в белодробен хомогенат – 33 стр.
2. Ефект на U-74389G при експериментален модел на колит – 45 стр.
 - 2.1. Избор на подходящ експериментален модел на възпалителни заболявания на червата (ВЗЧ) – 45 стр.
 - 2.2. Изследване на ефекта на U-74389G върху експериментален модел на ВЗЧ – 49 стр.
3. Изводи – 58 стр.
4. Заключение – 59 стр.

Научни приноси на дисертационния труд – 59 стр.

Списък на научни публикации – 60 стр.

СЪКРАЩЕНИЯ

АМ	Амиодарон
АИБТ	Амиодарон-индуцирана белодробна токсичност
БАЛТ	Бронхоалвеоларна лаважна течност
БК	Болест на Крон
ВЧЗ	Възпалителни заболявания на червата
ИББ	Интерстициална белодробна болест
КТ	Компютърната томография
НМК	Ненаситени мастни киселини
ПНМК	Полиненаситени мастни киселини
УК	Улцерозен колит
5-ASA	5-аминосалицилова киселина
АЕС	Алвеоларни епителни клетки
AGOP	Грануломатозна и организираща пневмония
AFOP	Остра фибринозна и организираща пневмония
AIPT	Индуцирана от амиодарон белодробната токсичност
AMs	Алвеоларни макрофаги
AMP	Антимикробни пептиди
AMPK	Аденозин монофосфат активирана протеин киназа
ARDS	Остър респираторен дистрес синдром
BALF	Бронхоалвеоларна лаважна течност
Breg	В регулаторни клетки
CAT	Каталаза
CL	Кардиолипин
CTD	Съединително тъканно заболяване
DAD	Дифузно алвеоларно увреждане
DAN	Дифузен алвеоларен кръвоизлив

DC	Дендритни клетки
DEA	Дезетиламиодарон
DI-ILD	Индуцираната от лекарства интерстициалната белодробна болест
DIP	Десквамативна интерстициална пневмония
DLCO	Дифузионен капацитет на белите дробове
DMARDs	Модифициращи заболяването антиревматични лекарства
ELISA	Ензимно-свързан имуносорбентен анализ
ENS	Чревна нервна система
FFA	Свободни мастни киселини
FVC	Форсиран витален капацитет
GCS	Глюкокортикостероиди
GSH	Редуциран глутатион
GPX	Глутатион пероксидаза
HLA	Човешкия левкоцитен антиген
HP	Хиперсензитивен пневмонит
IBD	Възпалителни заболявания на червата
ICI	Инхибитори на имунни контролни точки (immune checkpoint inhibitors)
IL	Interleukin (интерлеукин)
ILC	Вродени лимфоидни клетки
ILD	Интерстициална белодробна болест
IL-1α	Interleukin-1 alpha (интерлеукин-1 алфа)
IL-1β	Interleukin-1 beta (интерлеукин-1 бета)
IMiD	Имунно-модицирани възпалителни промени
iNOS	Индуцируема синтаза на азотен оксид
i.p.	Интраперитонеално
IPF	Идиопатична белодробна фиброза
i.t.	Интра трахеално
LH	Белодробен хомогенат
LP	Липидна пероксидация
MDA	Малонов диалдехид

MDP	Мурамил дипептид
MMP	Матрични металопроотеинази
MPO	Миелопероксидаза
MSC	Мезенхимни стромални клетки
NF-κB	Транскрипционен ядрен фактор- κ B
NOD	Домейн за олигомеризация, свързващ нуклеотиди
NSIP	Неспецифична интерстициална пневмония
NLR	NOD-подобни рецептори
OP	Организираща пневмония
PAMPs	Патогенно свързани молекулярни модели
Pr	Преднизолон
PF-ILD	Прогресивно фиброзираща интерстициална белодробна болест
PMN	Полиморфонуклеарни клетки
PPF	Прогресивна белодробна фиброза
PPFE	Плевропаренхимна фиброеластоза
PRRs	Рецептори за разпознаване на образци
RA	Ревматоиден артрит
RNS	Reactive nitrogen species (реактивни азотни видове)
ROS	Reactive oxygen species (реактивни кислородни видове)
SOD	Супероксид дисмутаза
SS	Сулфасалазин
TBARS	Реактивни субстанции на тиобарбитуровата киселина
TBI	Травматично мозъчно увреждане
TGF-β	Трансформиращ растежен фактор β
TLR	Toll-подобни рецептори
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha (тумор некрозис фактор алфа)
TZ	Тирилазаг мезилат (U-74006F)
WGS	Пълно геномно секвениране

ВЪВЕДЕНИЕ

Оксидативният стрес и хроничното тъканно възпаление представляват два от най-фундаменталните и взаимосвързани патофизиологични механизма, участващи в развитието и прогресията на широк спектър от заболявания. Нарушеното равновесие между продукцията на реактивни кислородни видове и капацитета на антиоксидантните защитни системи на организма води до увреждане на липиди, протеини и нуклеинови киселини, с последващо активиране на провъзпалителни сигнални каскади.

Реактивни кислородни видове (ROS) и реактивни азотни видове (RNS): супероксиден анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), водороден пероксид (H_2O_2), хидроксилен радикал ($\bullet OH$) и пероксинитрит ($ONOO^-$) се генерират физиологично в хода на клетъчния метаболизъм, но при патологични условия тяхната свръхпродукция надхвърля антиоксидантния капацитет, обусловен от ензими като супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GPX), както и от неензимни молекули като редуциран глутатион (GSH) и витамини Е и С. Следствие от оксидативния стрес е пероксидацията на мембранните фосфолипиди, процес, чийто краен продукт малондиалдехид (MDA) се използва рутинно като надежден биохимичен маркер. Паралелно с оксидативните увреждания, активирането на ядрения транскрипционен фактор NF- κ B задейства каскадна продукция на провъзпалителни цитокини като туморнекротизиращ фактор- α (TNF- α), интерлевкин- 1β (IL- 1β) и интерлевкин-6 (IL-6) и на индуцируема азотен оксид синтаза (iNOS). Тези медиатори поддържат хроничната възпалителна реакция и допринасят за тъканна деструкция при редица клинично значими нозологии. Взаимодействието между оксидативния стрес и възпалението формира патологично усилващ се порочен кръг: Реактивните кислородни и азотни видове активират NF- κ B, а провъзпалителните цитокини от своя страна стимулират допълнително генериране на реактивни радикали.

Амиодаронът е йодиран бензофуранов дериват с широко приложение в кардиологичната практика поради ефективния си контрол над животозастрашаващи камерни и надкамерни аритмии. Амиодарон-индуцираната белодробна токсичност (АИБТ) се развива при 5-10% от пациентите на дългосрочна терапия. Патоморфологично, АИБТ се изяснява като организираща се пневмония, дифузно алвеоларно увреждане или хронична интерстициална пневмония с прогресираща белодробна фиброза. В основата на увреждането стои директната цитотоксичност на амиодарона и неговия основен активен метаболит дезетиламиодарон (DEA), чиято плазмена концентрация при продължителна употреба надхвърля тази на изходното съединение. На клетъчно ниво амиодаронът нарушава митохондриалното дишане, инхибира лизозомалните фосфолипази и индуцира оксидативен стрес в алвеоларните макрофаги и пневмоцитите тип II — ключови ефекторни клетки в белодробната защита. Повишените нива на MDA, намалената активност на SOD и GPX, и характерните хистологични промени („пенести“ макрофаги, фиброзиращ алвеолит) са верифицирани в множество *in vivo* проучвания, включително в модела при плъхове чрез интратрахеално или системно приложение на амиодарон. Тъй като ефективно специфично лечение на АИБТ остава незадоволително, спирането на амиодарона и кортикостероидите са основните терапевтични опции. Търсенето на нови протективни молекули представлява актуален и клинично релевантен изследователски въпрос.

Възпалителните заболявания на червата (ВЧЗ) представляват хронични, рецидивиращи имуномедиирани нозологии с нарастваща глобална заболяемост. Въпреки напредъка в биологичното лечение, значителна част от пациентите не постигат трайна ремисия, което обосновава непрекъснатия интерес към нови терапевтични молекули. Интраректалното приложение на 2,4-динитробензенсулфонова киселина (DNBS) при плъхове е утвърден и широко валидиран животински модел, наподобяващ патоморфологичните и патохимичните характеристики на болестта на Crohn. DNBS-индуцираният колит се характеризира с трансмурална неутрофилна и макрофагова инфилтрация, крипти абсцеси, улцерации на лигавицата и значимо повишение на провъзпалителни

биомаркери TNF- α , IL-1 β и IL-6, включително миелопероксидаза (MPO) - специфичен ензимен маркер за неутрофилна активация. Едновременно с интензивния възпалителен отговор е документиран изразен оксидативен стрес в чревната стена с повишен MDA, редуцирани нива на SOD, CAT и GSH. Тежестта на колита се оценява чрез макроскопско скоричане, хистологичен анализ по стандартизирани скали и количествено определяне на горепосочените биохимични маркери. Моделът е чувствителен за регистриране на терапевтичен ефект на антиоксидантни и противовъзпалителни агенти, което го прави подходящ инструмент за изследване на потенциала на U-74389G.

U-74389G е синтетичен 21-аминостероид от групата на "лазароидите", клас съединения, разработени от компанията Upjohn в края на 80-те години на XX век с цел намаляване на оксидативното увреждане при исхемично-реперфузионни травми и различни форми на остро органно увреждане. Наименованието "лазароид" е метафора, препращаща към "съживяването" на клетки, застрашени от оксидативна смърт. Структурно, U-74389G притежава стероидна структура, лишена от глюкокортикоидна активност, но съдържаща аминова странична верига в позиция C-21, която предоставя допълнителен електронен донорен капацитет. Основният молекулярен механизъм на действие е инхибирането на пероксидацията на мембранните липиди чрез улавяне на пероксидови и хидроксилни радикали. За разлика от метилпреднизолон, U-74389G не се свързва с глюкокортикоидни рецептори и не проявява имunosупресивни или метаболитни нежелани ефекти, характерни за класическите кортикостероиди. Публикуваните до момента предклинични проучвания демонстрират, че U-74389G редуцира нивата на MDA, нормализира активността на антиоксидантните ензими и потиска провъзпалителните цитокини в разнообразни патологични модели; исхемично-реперфузионно увреждане на черен дроб, бъбреци и мозък, сепсис, остър панкреатит и рентгенова радиация. Данните за ефекта му върху белодробна токсичност с амиодарон и DNBS-индуциран колит остават осъществени, което обосновава настоящото изследване. Настоящото изследване бе насочено към проверка на хипотезата, че U-74389G може да упражни значим протективен ефект в два патологично различни, но свързани с оксидативен стрес и хронично възпаление модела: амиодарон-индуцирана белодробна токсичност и DNBS-индуциран колит при плъхове. Изборът на тези два модела е продиктуван от клиничната им релевантност, доброто им охарактеризиране в литературата и факта, че и двата обединяват интензивен оксидативен стрес с провъзпалителен отговор, именно спектърът от действие, за който U-74389G е теоретично обоснован протектор. Резултатите от настоящия труд биха допринесли за изясняване на терапевтичния потенциал на U-74389G при заболявания, в патогенезата на които оксидативният стрес и възпалението играят централна роля.

ЦЕЛ, ЗАДАЧИ, МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ

1. **Цел:** Да се изследват ефектите на лазароида U-74389G при експериментални модели на белодробна токсичност и възпалителни заболявания на червата.

2. Задачи

2.1. Експериментален модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност (АИБТ)

- 2.1.1. Да се избере подходящ модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност.
- 2.1.2. Да се изследват ефектите на U-74389G върху маркери за възпаление и цитотоксичност в БАЛТ (бронхо-алвеоларна лаважна течност) при амиодарон-индуцирана белодробна токсичност
- 2.1.3. Да се изследват ефектите на U-74389G върху основни звена на антиоксидантната защитна система, маркери за липидна пероксидация и белодробна фиброза в белодробен хомогенат (LH)
- 2.1.4. Да се изследват ефектите на U-74389G посредством хистопатологични методи

2.2. Експериментален модел на ВЗЧ (възпалителни заболявания на червата)

2.2.1. Избор на подходящ експериментален модел на ВЗЧ (възпалителни заболявания на червата)

2.2.2. Да се изследват ефектите на U-74389G върху интегрални показатели и макроскопски промени при 2,4-Dinitrobenzenesulfonic acid hydrate (DNBS) – индуциран колит

2.2.3. Да се изследват ефектите на U-74389G върху маркери за възпаление и липидна пероксидация

2.2.4. Да се изследват ефектите на U-74389G посредством хистопатологични методи

3. Материали и методични подходи:

Експериментите са проведени в лаборатория по експериментална физиология и фармакология на катедра „Фармакология и токсикология“ при МУ-Плевен. Проучването е проведено в съответствие с международните стандарти за грижа и използване на опитни животни (Европейска директива 2010/63/ЕС), както и с националното законодателство и политики и е одобрено от Българската агенция по безопасност на храните – Разрешително за използване на животни в опити №120/18.06.2015г.

3.1. Експериментални животни

В експерименталните модели са използвани общо 206 бели мъжки плъхове порода Wistar с тегло 200-250 грама (възраст 8-10 седмици), доставени от Експериментална развъдна база за опитни животни Сливница. Животните са отглеждани във вивариума на Медицински университет – Плевен за един месец при температура $22.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, при 12:12 часа светъл-тъмен цикъл, влажност на въздуха $50 \pm 10\%$ и свободен достъп до гранулирана храна и вода ad libitum.

3.2. Методични подходи при изследване на ефекта на лазароида U-74389G при експериментален модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност (АИБТ)

Тествани са 2 модела на АИБТ. При първия модел (M1) АМ беше прилаган интратрахеално, еднократно в доза 6,25 mg/kg като воден разтвор с концентрация 7,8 mg/ml. При втория модел (M2) АМ беше въвеждан интратрахеално, двукратно на ден 0 и 2, в доза 6,25 mg/kg като воден разтвор с концентрация 3,125 mg/ml. Въз основа на получените резултати, описани подробно в раздел „Резултати“ за подходящ модел беше избран този с двукратно приложение на АМ.

• Експериментални групи

Животните бяха разделени на случаен принцип на пет групи по 6 животни във всяка:

Група 1 (контролна група) получи две интратрахеални (i.t.) инстилации на **стерилна дестилирана вода** на ден 0 и 2 [Taylor MD et al., 2000].

Група 2 получи две i.t. инстилации на **амиодарон (АМ)** (6,25 mg/kg, в 3,125 mg/mL воден разтвор) на ден 0 и 2.

Група 3 беше третирана с **АМ** i.t. на ден 0 и 2 и **U-74389G** интраперитонеално (i.p.) трикратно – преди и два пъти след АМ приложение с 5 mg/kg телесно тегло [Данчева, 2014].

Група 4 беше третирана с **U-74389G** в същата доза и начин.

Група 5 беше третирана с **АМ** i.t. на ден 0 и 2 и **преднизолон (Pr)** 10 mg/kg телесно тегло интраперитонеално (i.p.) трикратно – преди и два пъти след АМ. В тази група са изследвани ефектите върху маркери за възпаление и белодробна фиброза.

За интратрахеално приложение на лекарството, АМ се разтваря в дестилирана вода при 60°C и се оставя да се охлади до стайна температура преди интратрахеалното вливане, както е описано по-горе [Card et al., 1999]. Първото вливане е извършено в ден, отбелязан като ден 0; второто приложение беше извършено на ден 2.

U-74389G се разтваря в CS-4 (воден разтвор на 20 mM монохидрат на лимонена киселина, 3,2 mM натриев цитрат дехидрат, 77 mM NaCl, pH=3) с концентрация от 2 mg/mL.

Преднизолонът се разтваря в DMSO (диметилсулфоксид), след това се разрежда в PBS (фосфатно буфериран физиологичен разтвор) и се прилага доза 10 mg/kg телесно тегло интраперитонеално (i.p.). След третирането животните се връщат към съответните им диети и вода ad libitum за остатъка от периода на изследването. При всички приложения са използвани индивидуални стерилни игли. Под тиопенталова анестезия (50 mg/kg) животните са умъртвени чрез обезкървяване на 3, 7, 14 и 28 ден.

- **Интегрални характеристики**

Измервани са телесна маса в грам; тегловен коефициент на белите дробове (маса на белите дробове в мг на 100 грама телесна маса) на 3, 7 и 28 ден.

- Получаване на **бронхоалвеоларна лаважна течност (БАЛТ, BALF)**. За да се получи бронхоалвеоларен лаважна течност, шест плъха от всяка група бяха евтаназирани на дни 3, 7 и 28 под тиопенталова анестезия (50 mg/kg) чрез обезкървяване чрез разрязване на v. celiac. Гръдният кош се отваря и белите дробове се перфузират in situ през дясната сърдечна камера с физиологичен разтвор (30 mL). Обемът на възстановената течност варира от 80 до 90% от въведената течност. Бронхоалвеоларният лаваж е получен като в трахеята на отрязания ляв бял дроб е поставена пластмасова канюла. Със спринцовка в дроба са вкарани последователно 5 mL физиологичен разтвор, разделен на 3 порции (2, 2, 1 mL). Всяка порция разтвор е задържана около 1 минута в органа преди да бъде аспирирана обратно. Аспирираното количество течност е поставено в пластмасови епруветки, съхранявани в съд с ледени блокчета. Бронхоалвеоларната лаважна течност е центрофугирана при 300xg в продължение на 10 минути. Супернатантата е отливана и използвана за биохимични изследвания. Към седимента е прибавен 1 mL 0.15 M разтвор на натриев хлорид за изброяване на общия брой клетки в камера на Бюркер. За диференциално броене на клетките в БАЛТ са вземани по 500 микролитра от останалата част на седимента.

- **Методи за изследване на бронхоалвеоларна лаважна течност:**

Общ брой клетки в БАЛТ ($\times 10^5/\text{мл}$) - чрез броене в камерата на Бюркер;

Диференциално броене на клетки в БАЛТ ($\times 10^5/\text{мл}$) – чрез броене в камерата на Бюркер, оцветяване по Wright-Giemsa;

Активност на ензима лактат дехидрогеназа в ME/мл – по метода на Bergmeyer (1974) [Bergmeyer et al., 1974];

Активност на ензима алкална фосфатаза в ME/мл – по метода на Bergmeyer (1974) [Bergmeyer et al., 1974];

Активност на ензима кисела фосфатаза в ME/мл – по метода на Bergmeyer (1974) [Bergmeyer et al., 1974];

Съдържание на общ белтък в мг/мл – по метода на Bradford (1976) [Bradford, 1976].

Ензимната активност е представена в ME/мл (една единица е дефинирана като 1 нмол субстрат превърнат за 1 минута).

Цитологични изследвания на БАЛТ. Една аликвотна част от BALF се използва за общ брой клетки $\times 10^5/\text{мл}$. След това клетките се отстраняват чрез центрофугиране при 300xg за 10 минути. Клетъчната пелета се ресуспендира в 1 mL физиологичен разтвор. Цитологичният препарат се оцветява по метода на Wright-Giemsa и се извършва диференциално броене на клетките.

Алвеоларните макрофаги бяха анализирани с помощта на модификация на процедурата на Danos и Keebler [Saltini C et al., 1984]. Клетките се събират върху нитроцелулозни филтри с диаметър 25 mm с пори 5 μm (SWP-025-00; Millipore Corp.) и се оцветяват с хематоксилин-еозин.

Биохимични анализи на BALF. След центрофугиране на BALF, супернатантата се използва за измерване на активността на ензими като лактат дехидрогеназа (LDH), кисела фосфатаза (AcPh), алкална фосфатаза (AlPh). Активностите са измерени по метода на Bergmeyer [Bergmeyer HU et al., 1974], а общото протеиново съдържание е измерено по метода на Lowry [Lowry OH et al., 1951]. Измерените ензимни активности са представени в U/L, а общият протеин - в mg/mL BALF.

- **Получаване на белодробен хомогенат.**

От десния бял дроб на плъхчета от всяка група беше приготвен белодробен хомогенат, а белите дробове на 3-4 бяха използвани за хистопатологични изследвания. Отваряше се гръдният кош и белите дробове се перфузираха през дясна камера с 30 мл физиологичен разтвор (3 x 10 ml). Превързваше се десния бял дроб близо до хилуса и се отрязваше за измерване на теглото и хомогенизиране. Десният бял дроб е отстранен и хомогенизиран в леденостудена 0,25 M захароза в съдържащ 50 mM Tris-HCl буфер, с pH = 7.4 (в съотношение 1:10). Белодробната тъкан е нарязана на малки късчета, след което е хомогенизирана в хомогенизатор с тефлонов пестик в посочения разтвор. Хомогенизирането е извършено на 2000 оборота за 18 тракции. Полученият хомогенат е центрофугиран в хладилна центрофуга K-24 при температура 4°C при 9000xg за 30 минути и супернатантата е съхранявана върху лед.

- **Методи за изследване на белодробен хомогенат**

Активност на ензима супероксид дисмутаза в МЕ/г тъкан – по метода на Maral (1977) [Maral et al., 1977]. Една единица активност на ензима супероксид дисмутаза е дефинирана като 50% инхибиция на редукцията на тетранитро блу тетразолиум до формазан.

Активност на ензима каталаза в мкат/г тъкан – по метода на Koroljuk (1988) [Koroljuk et al., 1988]. Една единица каталазна активност е представена като миликатали/г;

Активност на ензима глутатион пероксидаза в МЕ/г тъкан – по метода на Bershneider, модификация по Pereslegina (1989) [Pereslegina, 1989]. Една единица активност на ензимите глутатион пероксидаза е дефинирана като наномол продукт образуван за една минута;

Съдържание на малонов диалдехид (МДА) в нмол/г тъкан – за измерване му белодробната тъкан е хомогенизирана с 1.15% разтвор на калиев хлорид в съотношение 1:10 – по метода на Ohkawa et al. [Ohkawa H et al., 1979].

Плазмените концентрации на хидропероксид в нмол/мл (ROOH) са измерени по метода на Yagu [Yagi K et al., 1987].

Съдържание на общ белтък в мг/мл – по метода на Lowry (1951) [Lowry et al., 1974];

Съдържание на L-хидроксипролин в микрог/г тъкан – по метода на Bergman (1963) [Bergman a. Loxley, 1963];

Съдържанието на колаген в микрог/г тъкан – по метода на Комса (Komsa et al. 1996).

- **Хистопатологични изследвания**

Изследвани са материали от бял дроб, фиксирани в 10% разтвор на формалдехид за 24 часа и включени в парафинови блокчета. Тъканните материали са взети на съответните времеви интервали (дни) след третиране с химичен фактор. Тъканните срези с дебелина 3 микрометра са оцветени с хематоксилин-еозин (HE) за хистологично изследване.

- **Химикали.**

Амиодарон хидрохлорид (C₂₅H₂₉I₂NO₃.HCl; Кат. № A8423., Sigma-Aldrich), U-74389G (C₃₇H₅₀N₆O₂-C₄H₄O₄; Кат. № U5882, Sigma-Aldrich), всички други химикали и реагенти са закупени от Sigma-Aldrich Company.

- **Статистически анализ.**

Данните са представени в таблици и графики. Тест на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) и тест на Шапиро-Уилк (Shapiro-Wilk) са използвани за проверка на нормалността на разпределенията на изследваните променливи. Амплитудите на данните са сравнени чрез параметрични тестове за проверка на хипотези при две независими извадки – Student t-тест, а еднофакторен ANOVA post hoc LSD тест (least significant difference procedure) е използван за сравняване на амплитудите между повече от две групи данни с нормални разпределения. Данните са представени като средни стойности и стандартна грешка (m±SEM); статистическа значима разлика между групите се приема при p<0.05. Статистическата обработка на данните е извършена с компютърна програма STATGRAPHICS Plus 4.1 for Windows, SPSS 14 (Statistical Package for the Social Sciences) и Excel (Office 2007).

3.3. Методични подходи при изследване на ефекта на U-74389G при експериментален модел на колит

Опитите са одобрени от Българската агенция по безопасност на храните и са проведени в съответствие с Правилника за хуманно отношение към животните. Тествани са 3 модела на експериментален колит, посредством приложение на улцерогенния агент **2,4-Dinitrobenzenesulfonic acid hydrate (DNBS)**: DNBS 10 – с експериментален колит, предизвикан от 10 mg DNBS разтворен в 0.25 мл 50% алкохол, въведен ректално, със сонда на 8 см в колона; DNBS 20 и DNBS 30, с доза на DNBS съответно 20 и 30 mg. Въз основа на получените резултати, описани подробно в раздел „Резултати“ за подходящ модел беше избран този с DNBS в доза 30 mg, индуциращ възпроизводим колит във всички експериментални животни и е подходящ модел за изследване на ефекта на потенциални лекарства, например U-74389G.

- **Експериментални групи**

Опитните животни са разделени на 4 групи по 8 животни на случаен принцип:

Група 1. Контролна група - плъхчетата се третират интра ректално с **физиологичен разтвор** (n=8).

Група 2. DNBS група (n=8) Дозата от 30 mg **DNBS**, разтворена в 0.25 ml 50% етанол, се вкарва в дебелото черво еднократно с гумен катетър съгласно процедурата, описана от Morris et al. [Morris GP et al., 1989] и Wallace et al. [Wallace JL et al., 1995].

Група 3. U-74389G група (n=8) – лазароидът **U-74389G** се инжектира интраперитонеално в доза 5 mg/kg за 6 дни, започвайки 1 ден преди предизвикването на колит посредством **DNBS**. U-74389G се разтваря в разтвор на CS-4 (воден разтвор на 20 mM монохидрат на лимонена киселина, 3,2 mM натриев цитрат дехидрат, 77 mM NaCl, pH=3) в концентрация от 2 mg/mL.

Група 4. Сулфасалазин (SS) група (n=8) – плъхчетата с експериментален колит са третирани със сулфасалазин, перорално, в доза 300 mg/kg, веднъж дневно в продължение на 6 дни, започвайки 1 ден преди предизвикването на **DNBS** колит. Сулфасалазин се разтваря във фосфатно буфериран физиологичен разтвор, pH 7.2 в концентрация 0.2 mg/mL [Dik B, Sonmez G et al., 2018].

Публикувани са резултати от самостоятелно приложение на U-74389G, които не се различават статистически от контролите, поради което в експеримента няма група само с U-74389G [Stavreva GT et al., 2008].

На 6-ия ден животните се умъртвяват с комбинация от кетамин 90 mg/kg и ксилазин 10 mg/kg, след което се получават проби от сегмента на дебелото черво. Оценката на тежестта на чревното възпаление се извършва макроскопски и хистологично, следвайки критериите, докладвани от Antonioli [Antonioli L et al., 2007].

- **Оценка на тежестта на експерименталния колит. Интегрални характеристики**

Редица параметри бяха измерени от ден 0 до ден 6: **телесно тегло, прием на храна и вода, консистенция на изпражненията** (0=нормални, 1=редки изпражнения, 3=диария), **наличие на кръв в изпражненията** (0=отрицателен, 1 = положителен, 3 = профузно кръвене).

- **Метод за макроскопска оценка.**

Критериите за макроскопско оценяване на увреждане на дебелото черво са следните: **наличие на сраствания между дебелото черво и други органи** (0 – никакви, 1 – малки и 2 – големи сраствания); **наличие на язва** (0 – няма, 1 – хиперемия, 2 – язва без възпалителна реакция, 3 – рана с възпаление на едно място, 4 – язви и възпаление на две места, 5 – големи лезии, простиращи се на 1-2 см по протежение на дължина на дебелото черво, 6 – големи лезии, простиращи се над 2 см) и резултатът беше увеличен с 1 за всеки милиметър дебелина на стената на дебелото черво. Измерена е **дължината на дебелото черво**. Всички параметри бяха оценени независимо от двама души.

Дължина на дебелото черво. След евтаназията на животните се отделя колона и се почиства от фекални материи. След това се измерва теглото и дължината на органа. При DNBS-индуцирания модел на колит не се наблюдава значимо отлагане на колаген в тъканите, а по-скоро наблюдаваното

скъсяване е вследствие на контракция на гладкомускулния слой в стената на дебелото черво. Ректалната инстилация на DNBS предизвиква възпаление с последващо повишаване на медиатори на възпалението с контрахиращо действие по отношение гладката мускулатура на чревната стена.

Тегло на дебело черво и на дисталните 10 см от органа. Третирането с DNBS предизвиква повишаване на теглото на дебелото черво, корелиращо с тежестта на възпалението в засегнатия участък. Увеличението на теглото е най-вече за сметка на тъканния оток. Ексудацията на течност в интерстициалното пространство при възпаление се дължи на увеличен пермеабилитет на съдовете, свързан с разширяването на пространствата между ендотелните клетки на съдовата стена. Това се причинява от възпалителните медиатори, индуциращи биохимични промени в ендотелните клетки.

Удебеляване на чревната стена. Удебеляването на чревната стена е пропорционално на степента на възпаление и се дължи на тъканния оток, тъканната инфилтрация с възпалителни клетки (лимфоцити, моноцити, макрофаги, неутрофилни гранулоцити), както и пролиферацията на мезенхимни клетки с отлагане на интерстициален матрикс.

Площ на увредата. DNBS предизвиква видима с просто око увреда, изразяваща се в некроза и улцерации на епителния слой, а в по-тежките случаи и на подлежащите слоеве на чревната стена. Площта на епителна увреда е в пряка връзка с тежестта на възпалението. DNBS е силно реактивен хаптен и поради това се свързва ковалентно с тъканните протеини и ги модифицира. Клетките на моноцито-макрофагеалната система разпознават и фагоцитират хаптенизираните молекули и ги презентират на CD4 позитивните клетки. Това води до индукция на клетъчно-медирана имунна реакция на свръхчувствителност от забавен тип с главното участие на Th1 и Th17 лимфоцитите.

Адхезии към съседни органи. При възпалителните процеси в коремната кухина в процеса на възстановяване често се формират адхезии – сраствания от съединителна тъкан към съседни покрити с перитонеум органи, както и към оментума. Образоването на адхезии се обуславя от действието на секретирани вследствие възпалението цитокини, растежни фактори и молекули за клетъчна адхезия, които водят до пролиферация на фибробласти, мезотелни клетки, както и неоангиогенеза. Степента на изразеност на адхезии към съседни органи е в пряка зависимост от интензивността на възпалителната реакция.

- **Имунологични изследвания.**

Нивата на про- и противовъзпалителните цитокини TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-10 бяха анализирани в хранителната среда след 24-часовия период на култивиране. Концентрациите на цитокинен протеин бяха определени с имуноанализ с ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA). Анализът ELISA се извършва съгласно инструкциите на производителя. Всяка проба е тествана двойно.

Количество на IL-1, IL-6 и фактор на туморна некроза-алфа (TNF- α) в плазма са измерени в пикограм (pg)/ml чрез използване на ELISA. Китовете са закупени от R&D Systems, UK. Кръвните проби са центрофугирани на 2000xg за 20 минути и е отделена плазмата. Тя е съхранявана при $\leq 20^{\circ}\text{C}$. Всички реагенти са съхранявани при стайна температура. Към миши IL-6 кит контрол е добавен 1 ml дестилирана вода. За да се приготви достатъчно количество конюгат за една плака (96 гнезда) е добавен 0.5 ml конюгат концентрат към 11 ml конюгат разредител. Приготвен е 625 ml буфер за промиване (25 ml оригинален отмиващ буфер + 600 ml дестилирана вода). Приготвен е субстратен разтвор като са смесени цветните реагенти А и В в равни обеми за 15 минути. По 100 μl от получената смес е накапана във всяко гнездо. Миши IL-6 стандарт е смесен с 5 ml калибратор разтворител RD5T за получаване на основен разтвор от 500 pg/ml. Във всяка епруветка са пипетирани по 200 μl от калибратор разтворител RD5T. Основният разтвор е използван за получаване на серии на разреждане (падащо разреждане) и за построяване на стандартна крива. Миши IL-6 стандарт е използван като висок стандарт (500 pg/ml). Калибратор разтворител RD5T е използван като нулев стандарт (0 pg/ml). В центъра на всяко гнездо са добавени по 50 μl от разределения разтвор. Добавени са по 50 μl стандарт, контрол или проба. Плаката е покрита и инкубирана за 2 часа на стайна температура. След отливане всяко гнездо е промито петкратно с 300 μl отмиващ буфер. Добавени са 100 μl конюгат във всяко гнездо. Плаката отново е покрита и инкубирана за 2 часа на стайна температура, като всяко гнездо с

промило петкратно. Добавени са 100 µl субстратен разтвор в гнездата, инкубирани за 30 минути на стайна температура. Накрая са добавени 100 µl стопиращ разтвор. Пробите са отчетени при оптична плътност 450 нанометра от ELISA Reader, модел Stat Fax – 2100, произведен от Awareness Technology Inc.

- **Определяне на малонов диалдехид в серум на плъхове с DNBS-индуциран колит.**

Определянето на MDA (малонов диалдехид) на 6 ден е извършено с конкурентни ELISA китове на Elabscience® (кат. No E-EL-0060) съгласно протокола на производителя (7-мо изд., 2023). Пробите и стандартите са анализирани в дупликат. Абсорбансите са отчетени при 450 nm с мултифункционален четец за микроплаки Berthold Technologies Mithras LB 943.

- **Хистопатологични изследвания**

Микроскопското изследване на областите на възпаленото дистално дебело черво се извършва чрез светлинна микроскопия върху предметни стъкла, оцветени с хематоксилин и еозин. Хистологичните критерии включват промени в архитектурата на лигавицата, клетъчна инфилтрация, наличие на абсцес на криптата и изчерпване на бокалните (чашковидни) клетки. За целите на хистопатологичното изследване се вземат проби от променените участъци от органа, фиксират се в 10% буфериран формалдехид и след това се изготвят срези с дебелина 5 микрометра, като препаратите се оцветяват с хематоксилин и еозин. Описват се последователно промените в отделните участъци: мукозен епител с ламина проприя, крипти, субмукоза, мускулен слой. Отделните слоеве се описват според присъствието и изразеността на следните показатели: оток, полиморфнонуклеарна инфилтрация, мононуклеарна инфилтрация, улцерации, грануляционна тъкан, дилатации и деформации на крипти, митотична активност, редукция в броя на гоблетовите (чашковидни) клетки.

- **Химикали и реактиви.**

2,4-динитробензенсулфонова киселина хидрат (DNBS, CAS № 698999-22-3), U-74389G (CAS № 153190-29-5) сулфасалазин (CAS № 599-79-1) и всички химикали са получени от SigmaAldrich Com Ltd. ELISA комплекти (Rat IL-1 alfa ELISA комплект, Rat 1L-6 ELISA комплект, Rat 1L-10 ELISA комплект и TNF алфа плъх ELISA комплект) бяха закупени от R&D системи.

- **Статистически анализ.**

Резултатите бяха представени като средни стойности $\pm$ S.E.M. и бяха тествани чрез еднопосочна ANOVA, последвана от процедурата на Fisher за най-малко значима разлика като пост-хок тест. Р-стойност по-ниска от 0,05 се счита за значима. Анализите бяха извършени с помощта на статистически софтуер STATGRAPHICS® Centurion XV.

РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕТО И ОБСЪЖДАНЕ

1. Ефект на U-74389G при експериментален модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност (АИБТ)

1.1.Избор на подходящ модел на амиодарон индуцирана белодробна токсичност

При първия модел (M1) АМ беше прилаган интратрахеално, еднократно в доза 6,25 mg/kg като воден разтвор с концентрация 7,8 mg/ml. При втория модел (M2) АМ беше въвеждан интратрахеално,

двукратно на ден 0 и 2, в доза 6,25 mg/kg като воден разтвор с концентрация 3,125 mg/ml. На контролните групи беше въвеждана стерилна дестилирана вода интратрахеално.

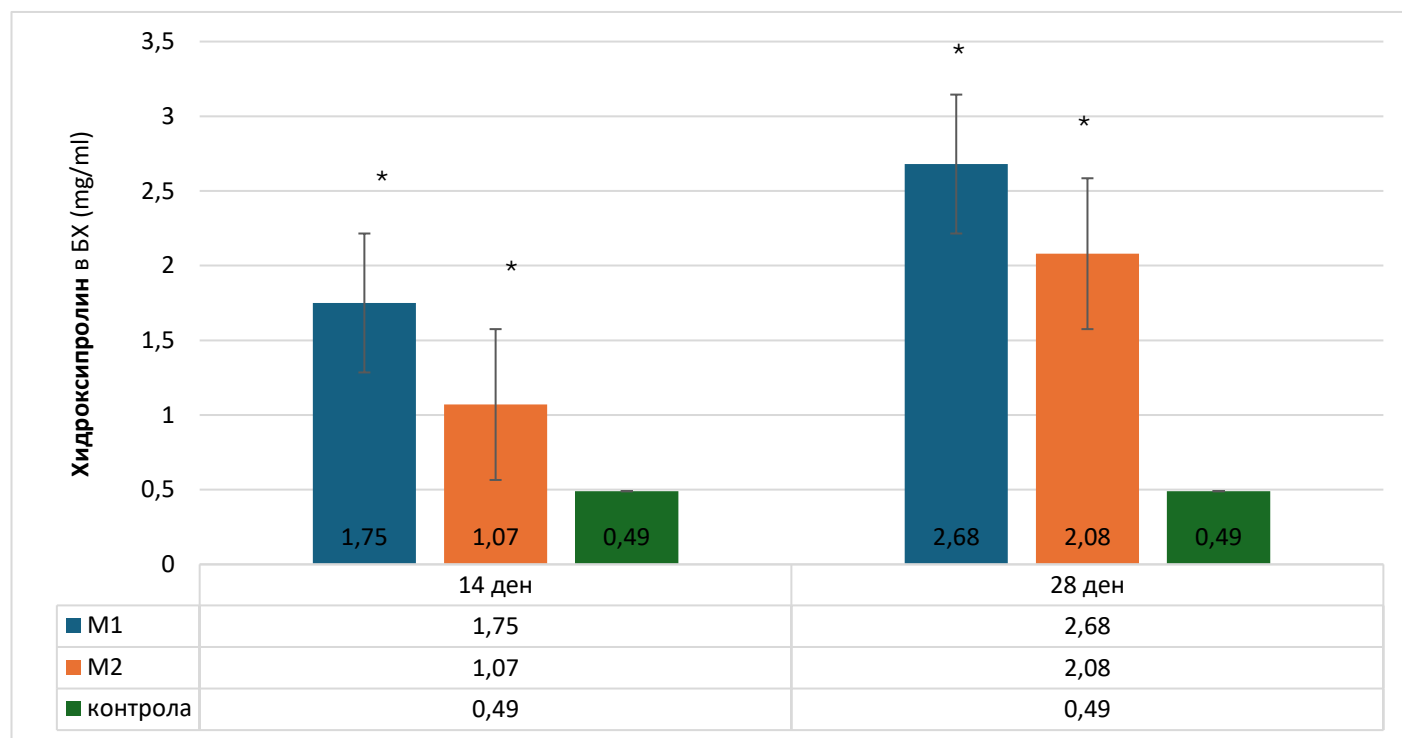
След въвеждането на АМ животните бяха неспокойни, наблюдаваше се учестено и шумно дишане, цианоза и настръхване на козината. При 10 от 20 третирани животни при М1, беше наблюдавана картина на дихателна недостатъчност и екзитус в рамките на 36 часа. Намерени бяха масивни белодробни хеморагии в белите дробове. При М2 от 20 третирани животни се регистрираха 2 летални случая (един на 0 и един на 2 ден, след второто въвеждане на АМ).

На 14 и 28 ден беше изследвано съдържанието на хидроксипролин и колаген в белодробен хомогенат като маркери за белодробна фиброза [Bergman I et al. 1963; Komsa et al. 1996]. Направени бяха хистопатологични изследвания на същите точки.

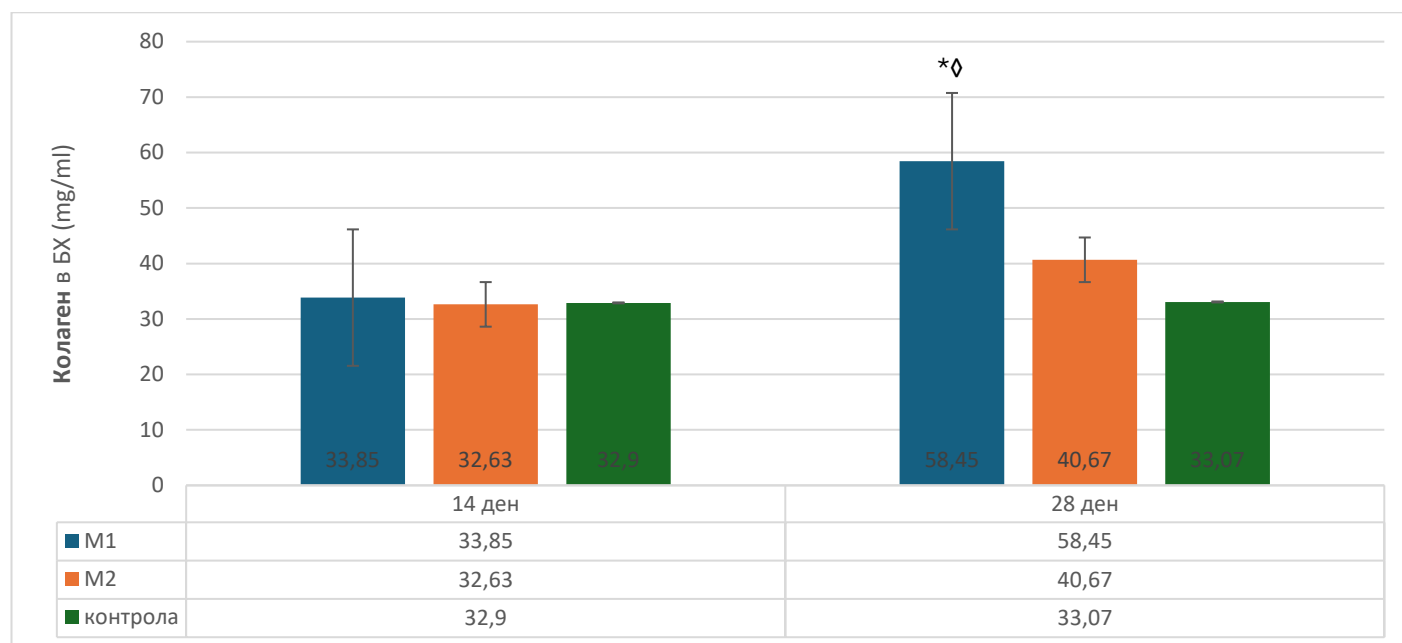
На 14 и 28 ден беше наблюдавано сигнификантно увеличение на съдържанието на **хидроксипролин** и при двата модела в сравнение с контролите (фиг. 1). Съдържанието му на 14 ден при М1 беше 1,749 mcg/ml, а при М2 – 1,071 mcg/ml. На 28 ден съдържанието на хидроксипролин в белодробния хомогенат на групите с модел едно е 2,677 mcg/ml, а при модел две – 2,083 mcg/ml (без статистически значима разлика между тях). Съдържанието на **колаген** в ml белодробен хомогенат беше увеличено статистически достоверно на 28 ден при М1 (фиг. 2).

И при двата изследвани модела бяха наблюдавани биохимични и хистопатологични промени, доказващи развитието на белодробна фиброза. Хистопатологичните промени при двата модела са идентични: на 14 ден показаша цианоза и оток, единични кръвоизливи и сидерофаги. Съдовите ендотелии, а също и съдовите миоцити бяха с вакуолизирана цитоплазма. Налице бяха венозни микротромби. Фиброзата беше леко представена перивазално, интерстициално и перибронхиално, а субплеврално и интраалвеоларно – оскъдно.

На 28 ден беше наблюдавано персистиране на цианозата и отока, единични кръвоизливи и малки групи сидерофаги, съдовите ендотелии и миоцити бяха с вакуолизирана цитоплазма. Фиброзата беше умерено представена перивазално и интерстициално, леко представена перибронхиално, субплеврално и интраалвеоларно.



Фиг. 1. Съдържание на **хидроксипролин** в ml белодробен хомогенат на 14 и 28 ден след третиране с АМ. * означава статистическа достоверност спрямо контролната група, $p < 0.05$.



Фиг. 2. Съдържание на **колаген** в ml белодробен хомогенат на 14 и 28 ден след третиране с АМ. * означава статистическа достоверност спрямо контролната група, ◇ – между M1 и M2; $p < 0.05$.

Еднократно интратрахеално въвеждане на АМ в доза 6,25 mg/kg с концентрация 7,8 mg/ml (M1) води до изразена белодробна фиброза, съпоставима с тази, предизвикана от референтния модел (M2) - двукратно, интратрахеално въвеждане на ден 0 и 2, в доза 6,25 mg/kg с концентрация 3,125 mg/ml. Въпреки, че M1 е технически по-лесно изпълним, поради еднократното интратрахеално третиране и еднакво фиброгенен с M2, не може да се препоръча като удачен модел за АИБТ поради по-високия леталитет сред опитните животни.

1.2.Ефектите на U-74389G върху маркери за възпаление и цитотоксичност в БАЛТ (бронхо-алвеоларна лаважна течност) при амиодарон-индуцирана белодробна токсичност

След интратрахеално приложение амиодарон на ден 0 и 2 се наблюдават бързо повърхностно дишане, загуба на апетит, цианоза и гъша кожа. Тези симптоми са по-слабо изразени в групата, лекувана с АМ и U-74389G. **Телесното тегло** на плъховете в АМ групата и в групата, с приложение на комбинация от АМ и U-74389G, намалява леко на ден 7. Десният бял дроб беше претеглен и относителното тегло беше изчислено за всяко животно. Увеличаването на мокрото тегло на белия дроб е един от индикаторите, представляващи белодробен оток. Както е показано в Таблица 1, **коэффициентът на белодробно тегло** се увеличава приблизително два пъти спрямо контролната група на ден 3 след АМ приложение и намалява постепенно след това. Индуцираният от АМ повишен коефициент намалява след прилагането на U-74389G, но не значително (фиг. 3).

Съдържанието на **протеин** в безклетъчната БАЛТ се измерва като индекс на пропускливостта на алвеоларно-капилярната бариера (Фиг. 4). В съответствие с развитието на белодробно възпаление и увреждане на алвеоларната цялост, третирането с АМ води до значително рязко повишени нива на общо съдържание на протеин на 3-тия ден (387%). Комбинираното приложение на АМ и U-74389G повишава съдържанието на протеин, но то е значително по-ниско – двукратно намаление в сравнение с АМ на 3-ия ден след инстилациите на АМ. Общото съдържание на протеин в БАЛТ не се различава статистически от това на контролната група в по-късни времеви точки.

Таблица 1. Ефект на U-74389G върху коефициента на белодробно тегло и цитологичните параметри в бронхоалвеоларната лаважна течност след интратрахеално приложение на АМ

параметри /третиране	Време в дни след първоначално приложение на АМ		
	Ден 3	Ден 7	Ден 28
	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM
Коефициент белодробно тегло			
Контрола	0.55±0.07	0.68±0.09	0.62±0.63
АМ	1.03±0.13 (*p=0.012)	0.91±0.08	0.76±0.04
АМ+U-74389G	0.93±0.08	0.78±0.12	0.79±0.07
U-74389G	0.708±0.11	0.69±0.09	0.62±0.07
Протеин в БАЛТ mg/mL			
Контрола	0.67±0.03	0.63±0.12	0.46±0.04
АМ	2.52±0.09 (*p=0.034; ◇p=0.043)	0.99±0.17	0.55±0.03
АМ+U-74389G	0.79±0.02	0.65±0.02	0.52±0.09
U-74389G	0.42±0.05 (◇p=0.001)	0.44±0.04	0.41±0.03
Общ брой клетки x10⁵/mL			
Контрола	7.43±2.99	7.43±2.99	6.69±0.97
АМ	31.62±2.96 (*p=0.001)	11.37±1.58	6.78±0.55
АМ+U-74389G	23.26±3.50 (*p=0.016)	10.52±1.59	5.78±0.48
U-74389G	10.74±1.76 (◇p=0.018)	8.81±1.16	5.23±0.75
PMNs x10⁵/mL / %			
Контрола	0.32±0.02/4.3%	0.32±0.02/4.3%	0.29±0.01/4.5%
АМ	22.92±1.85 (*p=0.008; ◇p=0.033)/71.0%	3.26±0.45/28.7% (*p=0.001; ◇p=0.041)	0.85±0.07/12.7% (*p=0.001; ◇p=0.002)
АМ+U-74389G	13.02±2.69 (*p=0.024)/52.1%	0.96±0.15/10.1% (*p=0.001)	0.57±0.05/9.8%
U-74389G	1.62±0.99 (◇p=0.006)/10.6%	0.48±0.02/5.3% (◇p=0.012)	0.39±0.05/7.4% (◇p=0.001)
AMs x10⁵/mL / %			
Контрола	6.74±0.38/92.6%	6.74±0.38/92.7%	6.20±0.29/92.7%
АМ	8.07±0.65/24.8%	7.15±0.99/63.9%	5.41±0.47/80.6%
АМ+U-74389G	10.32±2.14 (*p=0.044)/44.5%	8.83±1.34/84.2%	4.87±0.40/87.0%
U-74389G	12.38±1.54 (*p=0.026)/84.2%	7.93±1.05/89.9%	4.66±0.63/77.5%
Lym x10⁵/mL / %			
Контрола	0.23±0.01/3.1%	0.23±0.01/3.1%	0.21±0.61/3.1%
АМ	1.36±0.11% (*p=0.001)/4.2	0.89±0.12 (*p=0.001)/7.9%	0.43±0.04 (*p=0.001; ◇p=0.021)/6.7%
АМ+U-74389G	1.09±0.13 (*p=0.001)/4.7%	0.59±0.09 (*p=0.001)/5.7%	0.25±0.02/4.2%
U-74389G	0.76±0.09 (*p=0.012)/5.2%	0.42±0.06/4.8%	0.19±0.03/3.6%

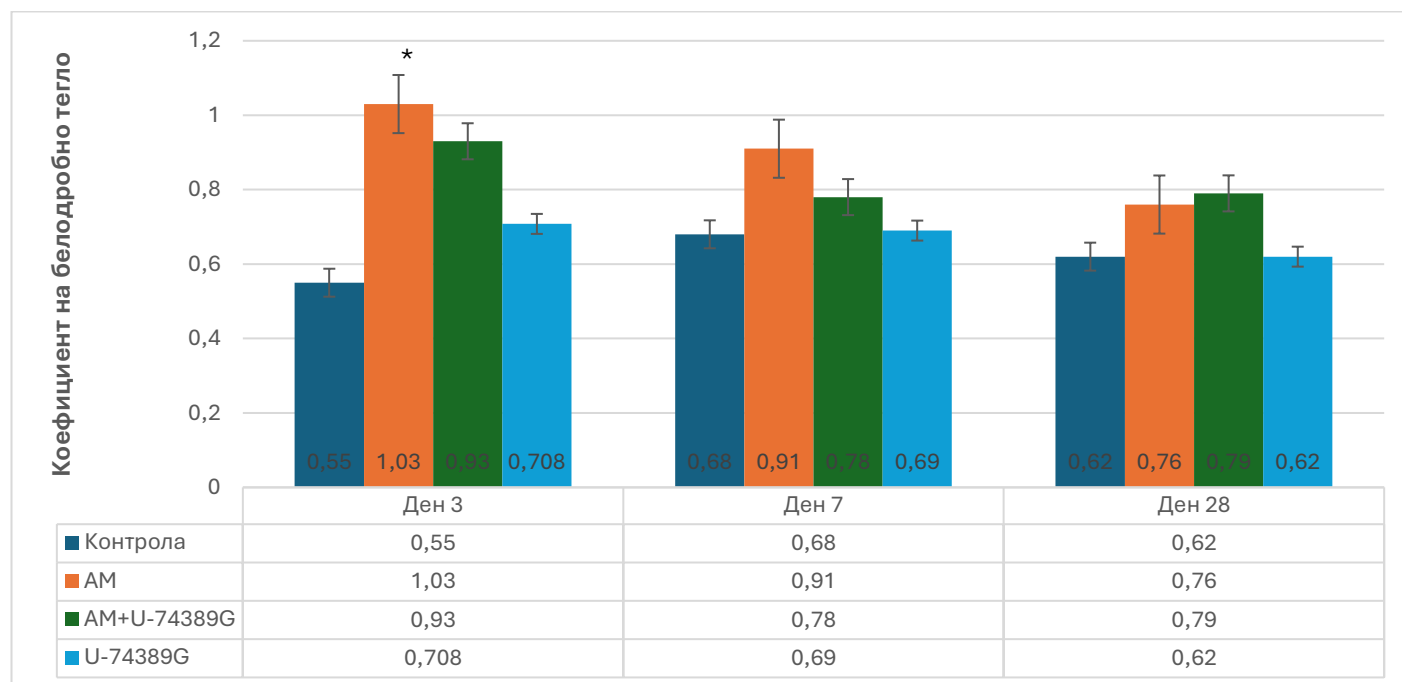
Съкращения: PMNs - полиморфонуклеарни левкоцити; AMs -алвеоларни макрофаги; Lym -лимфоцити; БАЛТ - бронхоалвеоларна лаважна течност

*p< 0.05 спрямо контролната група, ◇p<0.05 спрямо групата АМ+U-74389G

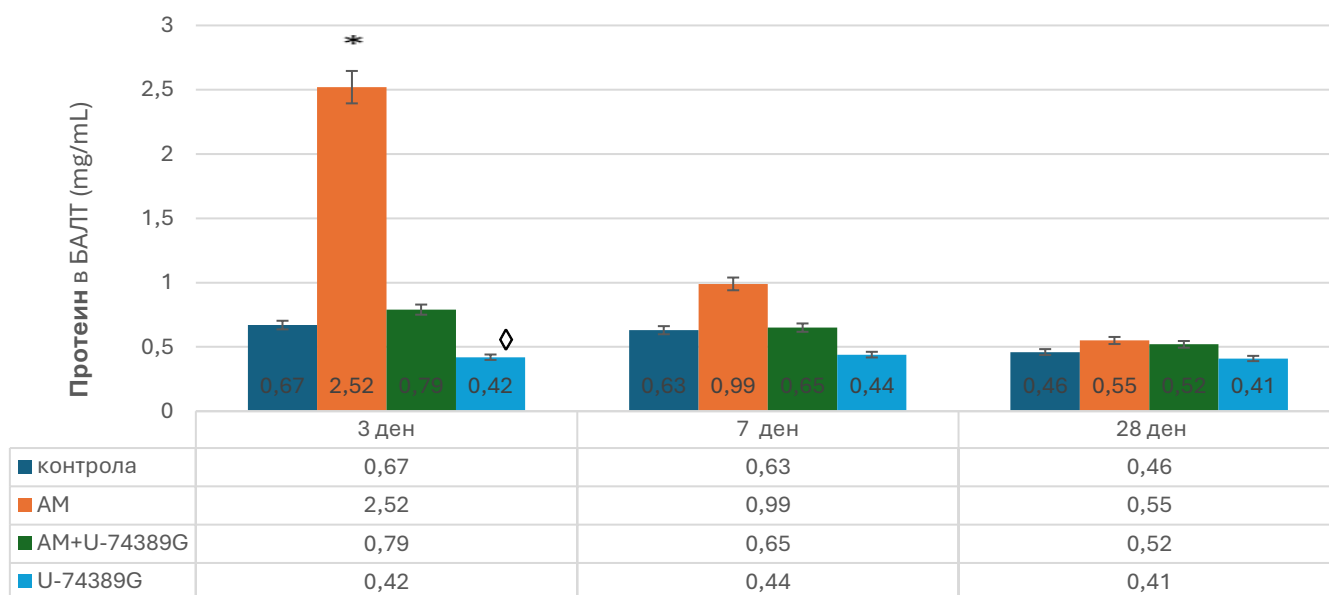
Прилагането на АМ беше придружено от екстремно увеличение както на **общия брой клетки**, така и на отделните типове клетки, изолирани от БАЛТ на ден 3. Общият брой клетки беше значително повлиян от третирането с АМ (425%) и комбинация АМ и U-74389G (313%) на ден 3, в сравнение с контролите (Фиг. 5). Не са открити значителни разлики в общия брой клетки на БАЛТ между групите на 7 и 28 ден.

Ефектът на лазароида върху алвеоларните макрофаги е оценен чрез определяне на абсолютният им брой и тяхната морфология по модификация на процедурата на Danos и Keebler [Saltini C et al., 1984]. Абсолютният брой на **алвеоларните макрофаги (AMs)** в БАЛТ е повишен след интратрахеален АМ на ден 3 (Фиг. 7).

На 3 ден от експеримента алвеоларните макрофаги в БАЛТ на групата, третирана с амиодарон, присъстваха в широк диапазон от размери, от малки, подобни на моноцити клетки до много големи, зрели макрофаги, съдържащи две или повече разделени ядра и вакуолизирана пенлива цитоплазма (Фигури 8 и 9). Клетките са едри, с неправилна до закръглена форма. Обилна, бледо-виолетова цитоплазма, с неясни граници. Наблюдава се характерна „размазана“ цитоплазмена периферия, типична за макрофаги. Обилна цитоплазма с вакуолизиран, пенест вид. Ядрата са ексцентрично разположени. Закръглени до бъбрековидни. Видно е ядърце в някои клетки – знак за активация. Често се наблюдават апоптотични клетки с нарушен мембранен интегритет, както и клетки – многоядрени гиганти.

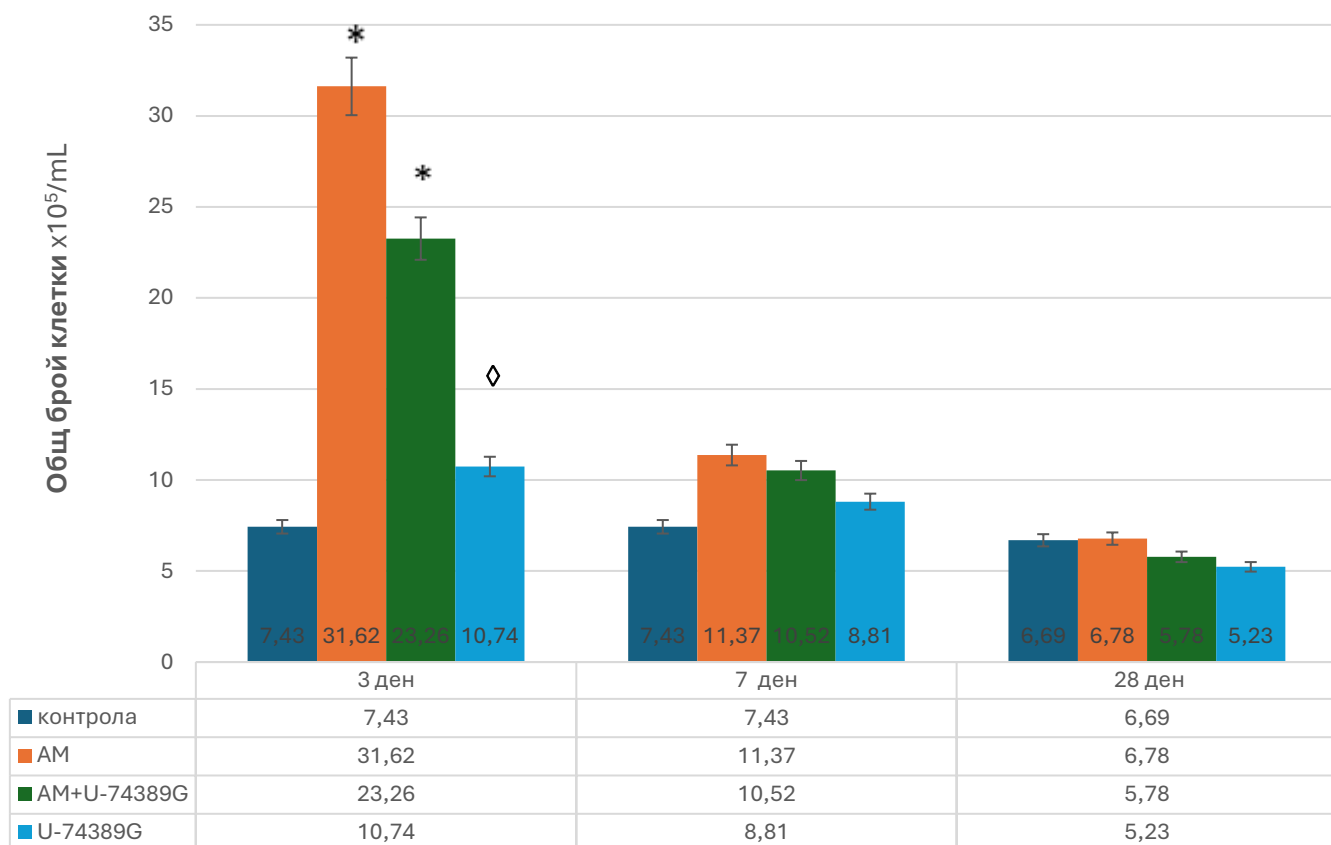


Фиг. 3. Влияние на U-74389G върху коефициента на белодробно тегло след индуцирано от AM белодробно увреждане; * $p < 0.05$ спрямо контролната група



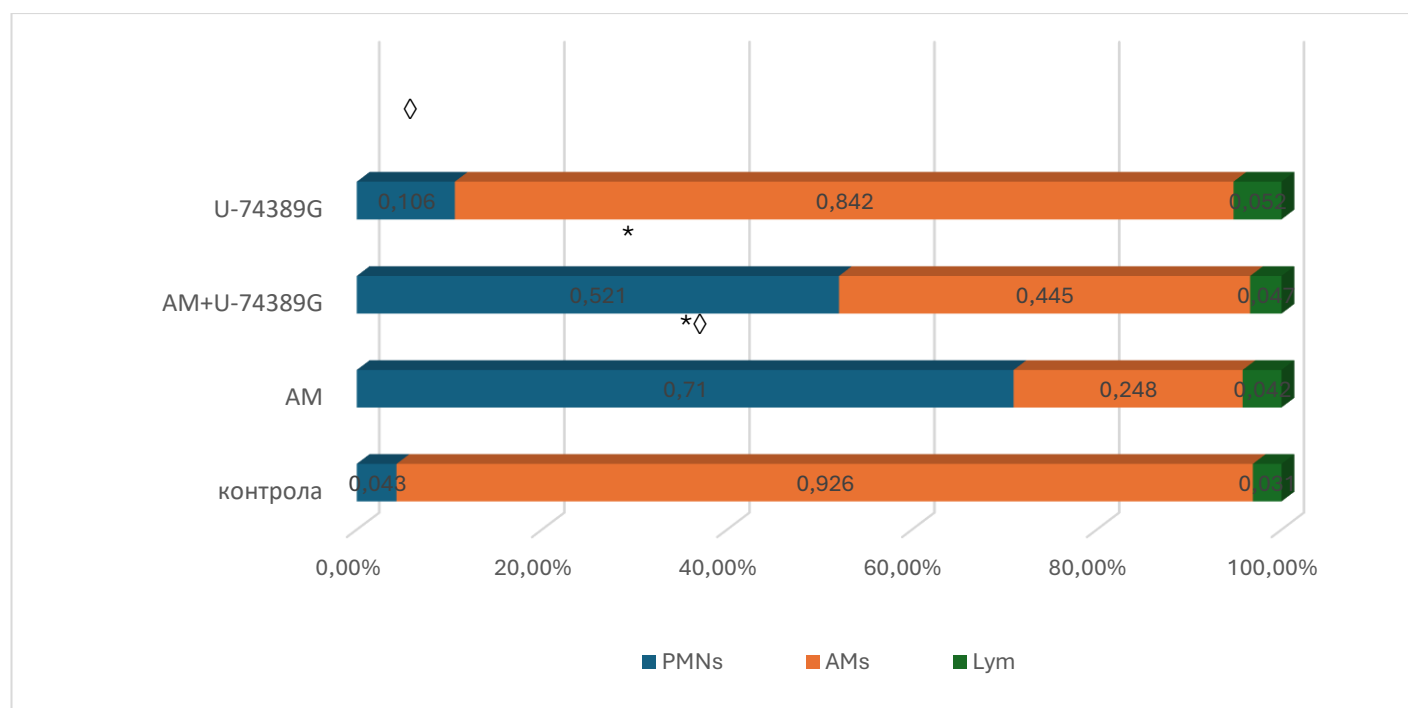
Фиг. 4. Влияние на U-74389G върху протеиновото съдържание в БАЛТ след индуцирано от AM белодробно увреждане;

* $p < 0.05$ спрямо контролната група; $\diamond p < 0.05$ спрямо групата с комбинация AM+U-74389G.



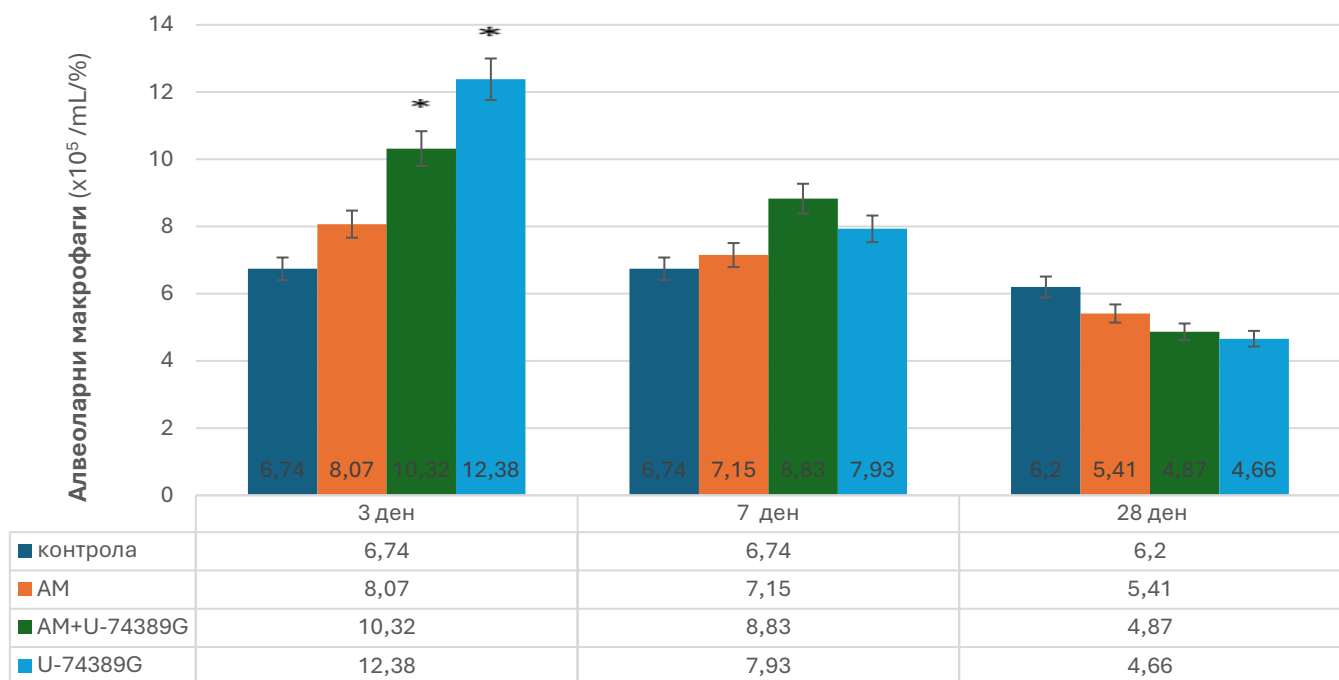
Фиг. 5. Влияние на U-74389G върху **общия брой клетки** в БАЛТ след индуцирано от АМ увреждане на белия дроб

* $p < 0.05$ спрямо контролната група; ◇ $p < 0.05$ спрямо групата с комбинация АМ+U-74389G

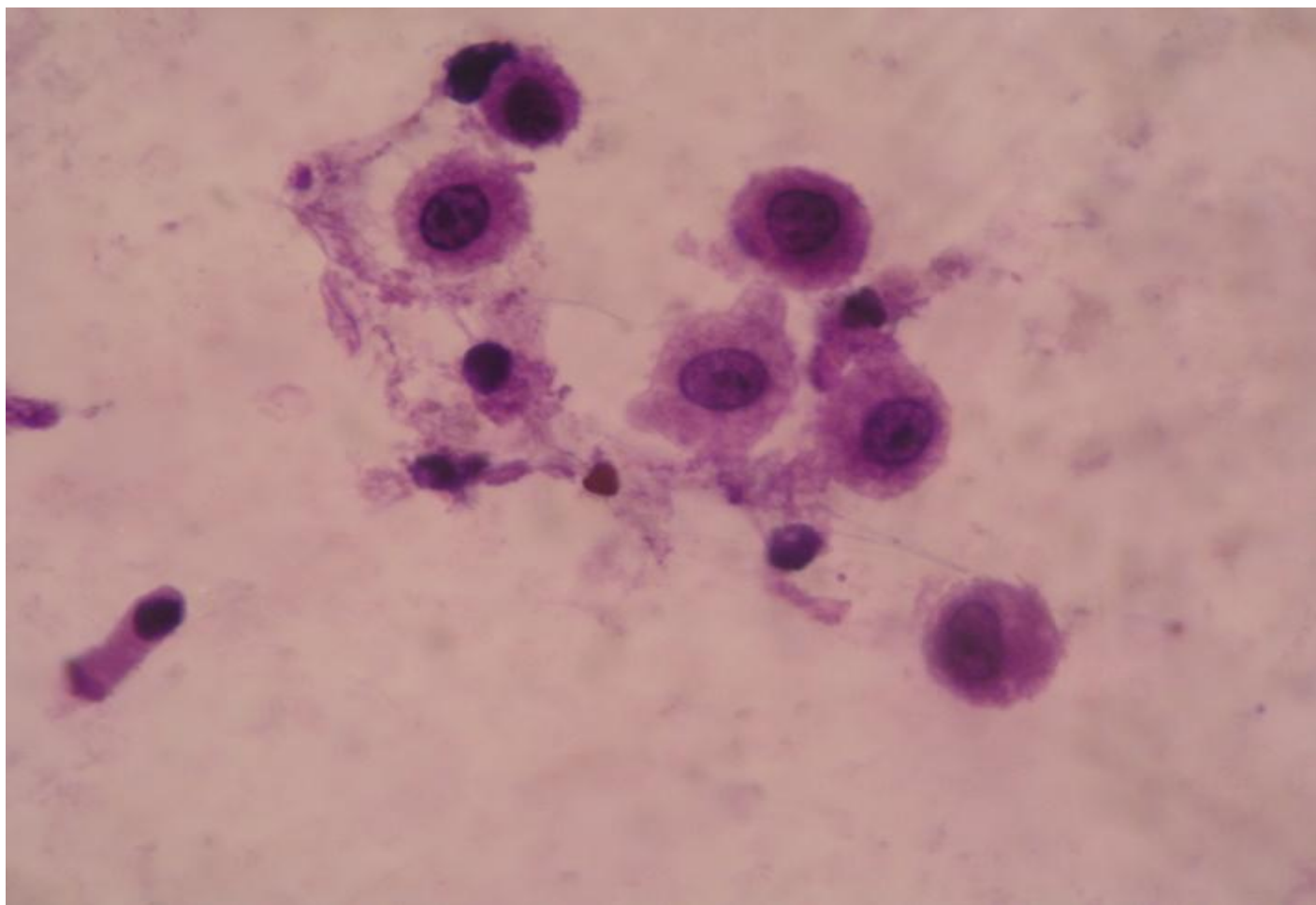


Фиг 6. Влияние на U-74389G върху **типовете клетки** в БАЛТ след индуцирано от АМ увреждане на белия дроб на ден 3. Съкращения: PMNs - полиморфонуклеарни левкоцити; AMs -алвеоларни макрофаги; Lym -лимфоцити

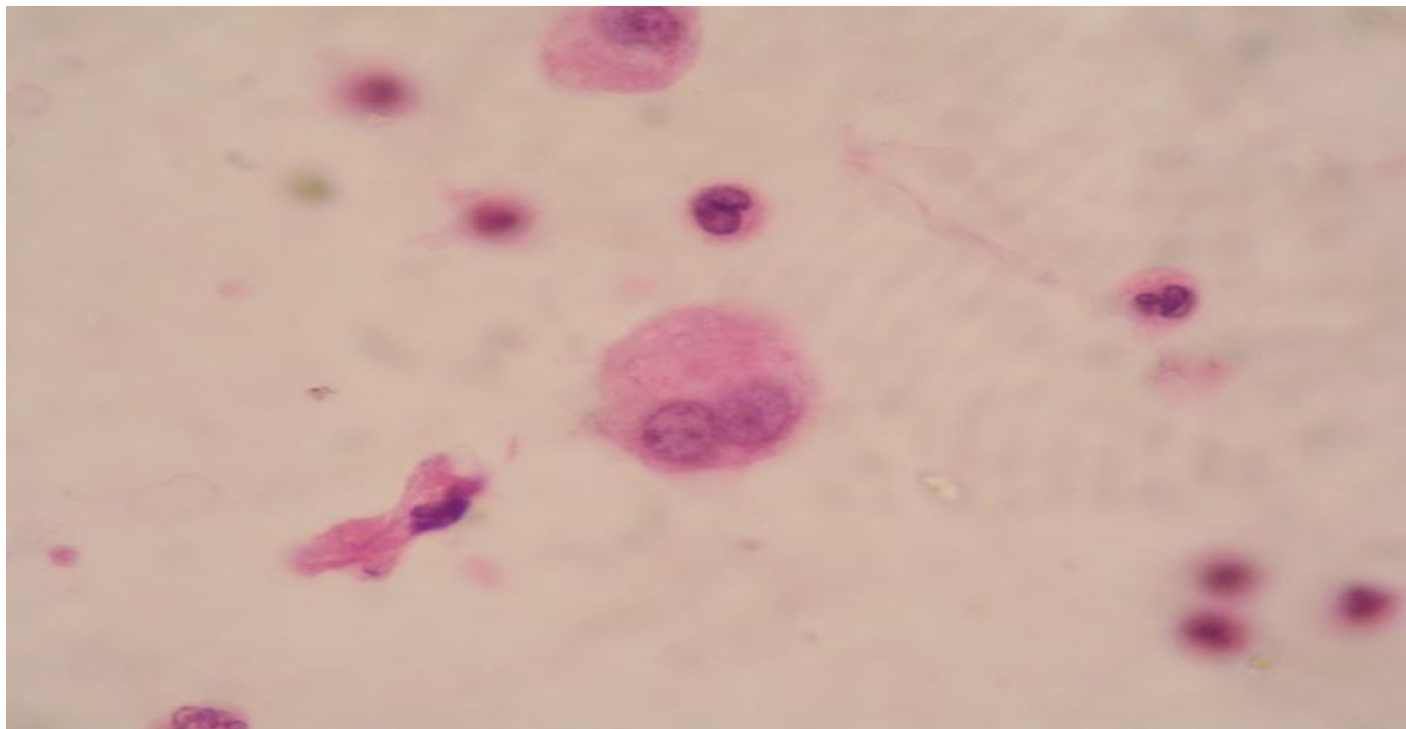
* $p < 0.05$ спрямо контролната група; ◇ $p < 0.05$ спрямо групата с комбинация АМ+U-74389G



Фиг 7. Влияние на U-74389G върху алвеоларните макрофаги (AMs) в БАЛТ след индуцирано от AM увреждане на белия дроб; * $p < 0.05$ спрямо контролната група

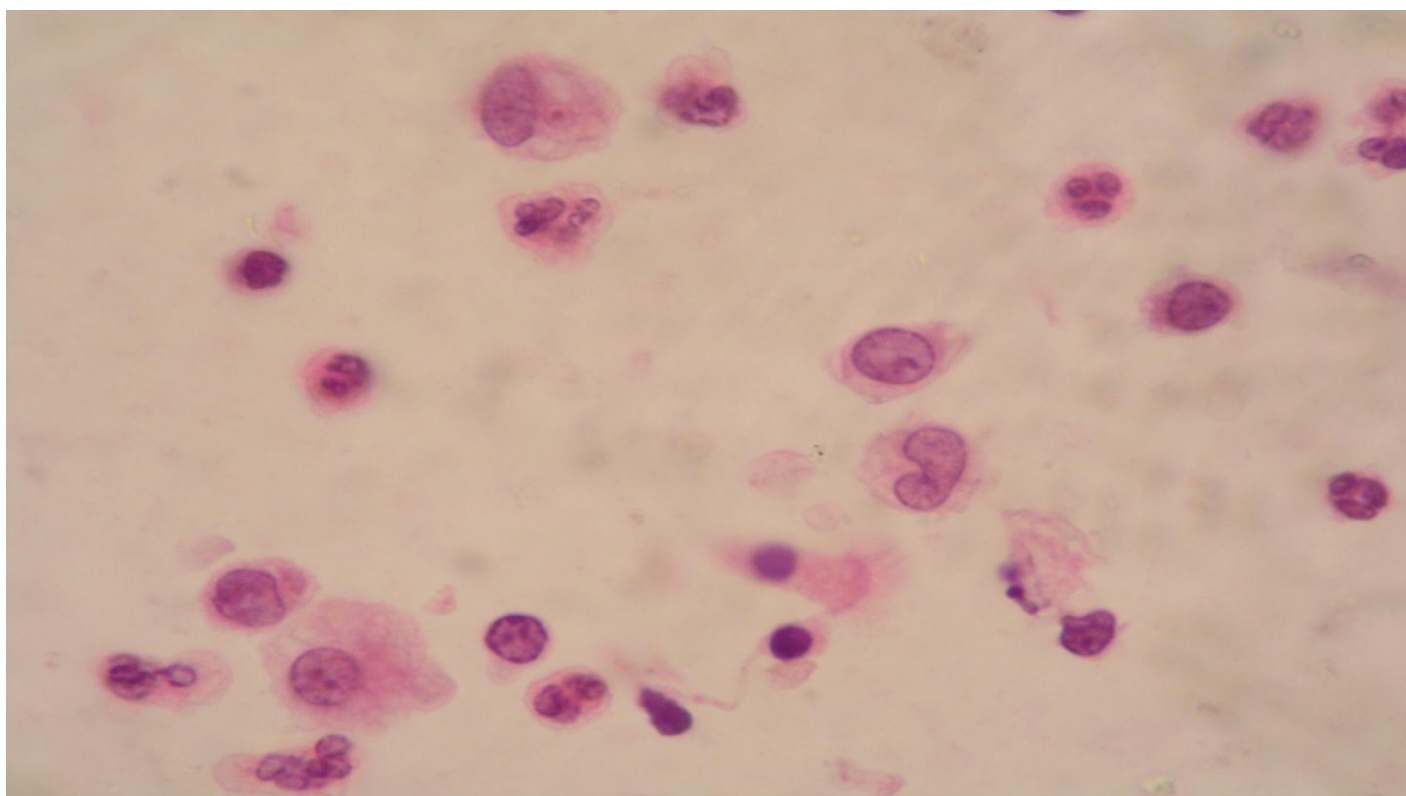


Фиг. 8. Морфологичен изглед на хематоксилин-еозин оцветени клетки, налични в БАЛТ на 3 ден от експеримента след приложение на амиодарон. Увеличение 40x



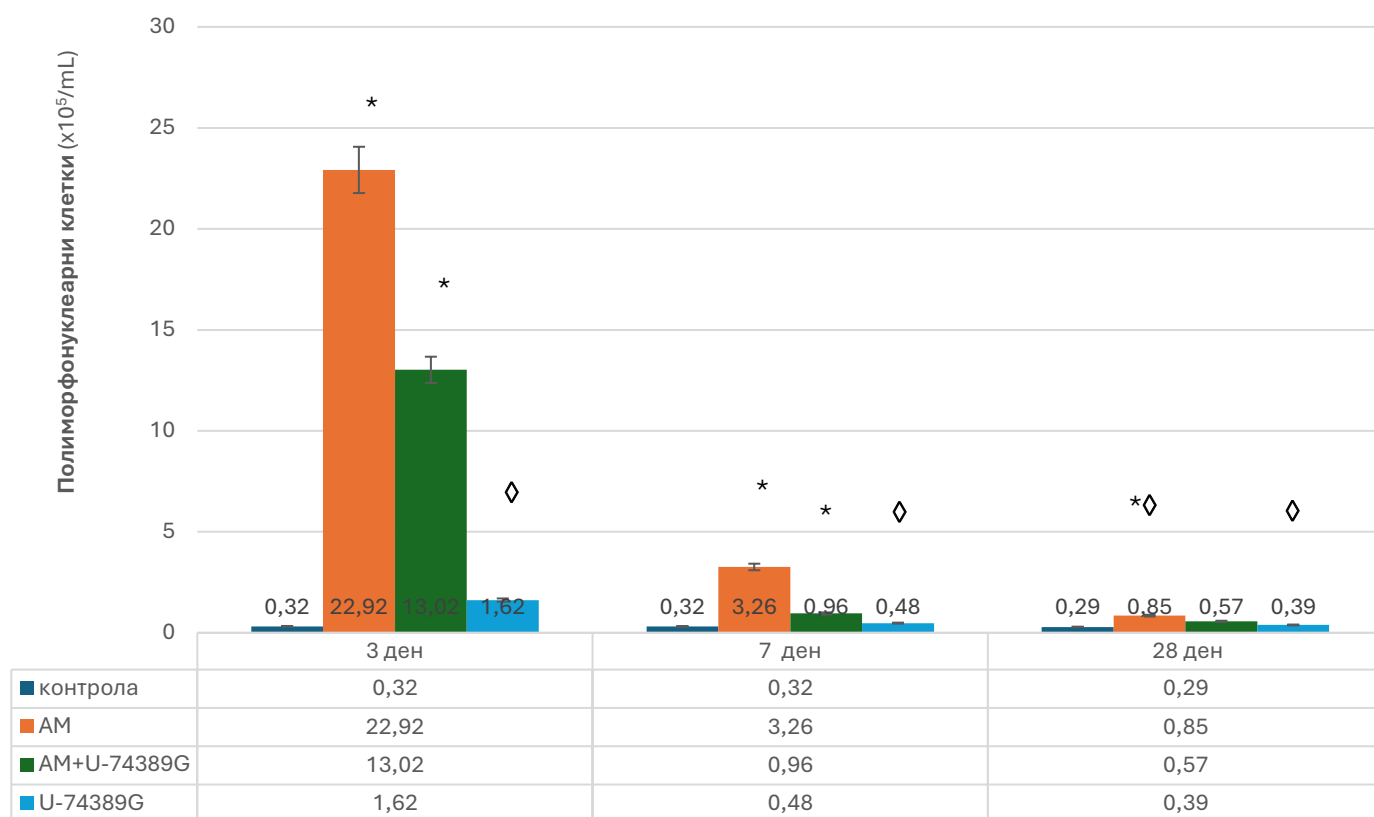
Фиг. 9. Морфологичен изглед на хематоксилин-еозин оцветени клетки, налични в БАЛТ на 3 ден от експеримента след приложение на амиодарон. Увеличение 40х

На 3 ден от експеримента в групата, третирана с амиодарон, но протектирана от U-74389G, почти няма големи активирани алвеоларни макрофаги в БАЛТ. Размерът на макрофагите е по-близък до нормалния, те са с редуцирана вакуолизация и по-добре запазен мембранен интегритет. Значително по-малко са и апоптичните клетки, значително редуцирани са и клетките многоядрени гиганти (фиг. 10)



Фиг. 10. Морфологичен изглед на хематоксилин-еозин оцветени клетки, налични в БАЛТ на 3 ден от експеримента след приложение на амиодарон + U-74389G. Увеличение 40х

Процентът на **полиморфонуклеарните клетки (PMN)** в БАЛТ се повишава значително в групата, лекувана с АМ на 3, 7 и 28 дни, когато достига съответно 71,0%, 28,7% и 12,7% от общия брой клетки (Фиг. 11). Той остава относително по-висок, въпреки тенденцията за намаляване на дни 7 и 28. Приложението на U-74389G значително отслабва индуцираното от АМ повишаване на броя на полиморфонуклеарните клетки.



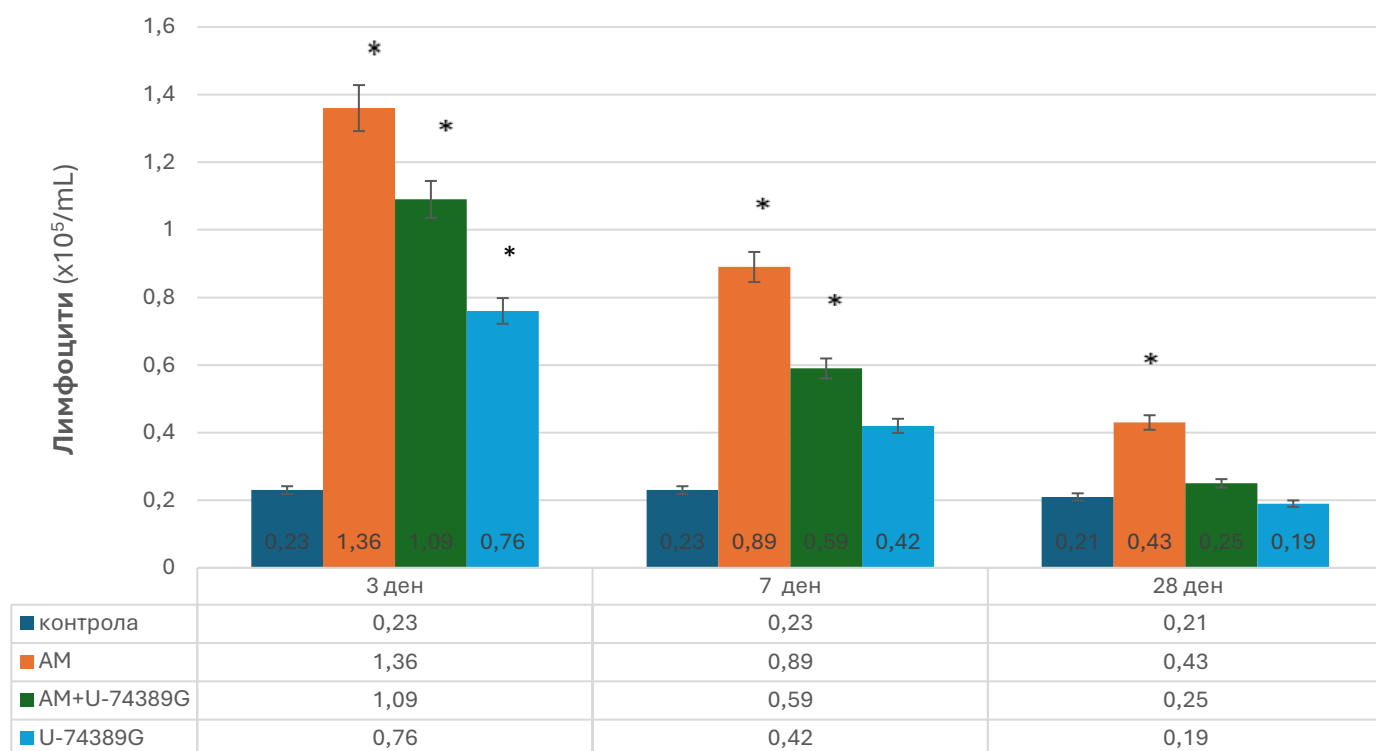
Фиг 11. Влияние на U-74389G върху **полиморфонуклеарните клетки (PMN)** в БАЛТ след индуцирано от АМ увреждане на белия дроб на ден 3

* $p < 0.05$ спрямо контролната група; ◇ $p < 0.05$ спрямо групата с комбинация АМ+U-74389G.

Лимфоцитите, получени чрез БАЛТ, са значително повишени в АМ групата и АМ плюс U-74389G групата в сравнение с контролата. Броят на лимфоцити в групата с комбинирано лечение е по-нисък на ден 3 и 7 и значително намалява на ден 28 спрямо групата АМ (Фиг. 12). Понякога в пробите се наблюдават еозинофили и базофили.

Резултатите от **ензимните активности** при БАЛТ са показани на Таблица 2. **Лактатдехидрогеназната активност (LDH)** в първата БАЛТ фракция беше използвана като индикатор за клетъчна смърт и увреждане. LDH изтича от мъртви или увредени клетки, когато целостта на мембраната е нарушена. След вливане на АМ, активността на LDH в БАЛТ е значително повишена, с пиково увеличение на ден 3 (294%) и нормално ниво се наблюдава на ден 28 (фиг. 13). Прилагането на U-74389G не отслабва индуцираното от АМ повишаване на активността на LDH в BALF на ден 3 и 7.

Вижда се, че влиянието на лечението с АМ върху активността на **киселата фосфатаза (AcPh)** следва същата тенденция като активността на LDH (фиг. 14). Активността на AcPh е леко намалена от U-74389G при животни, третирани с АМ на ден 7. Наблюдава се значително повишаване на активността на AcPh в BALF на плъхове от АМ по време на експеримента и лечението с U-74389G не води до намаляване на повишението на AcPh.



Фиг 12. Влияние на U-74389G върху лимфоцитите (Lym) в БАЛТ след индуцирано от AM увреждане на белия дроб на ден 3

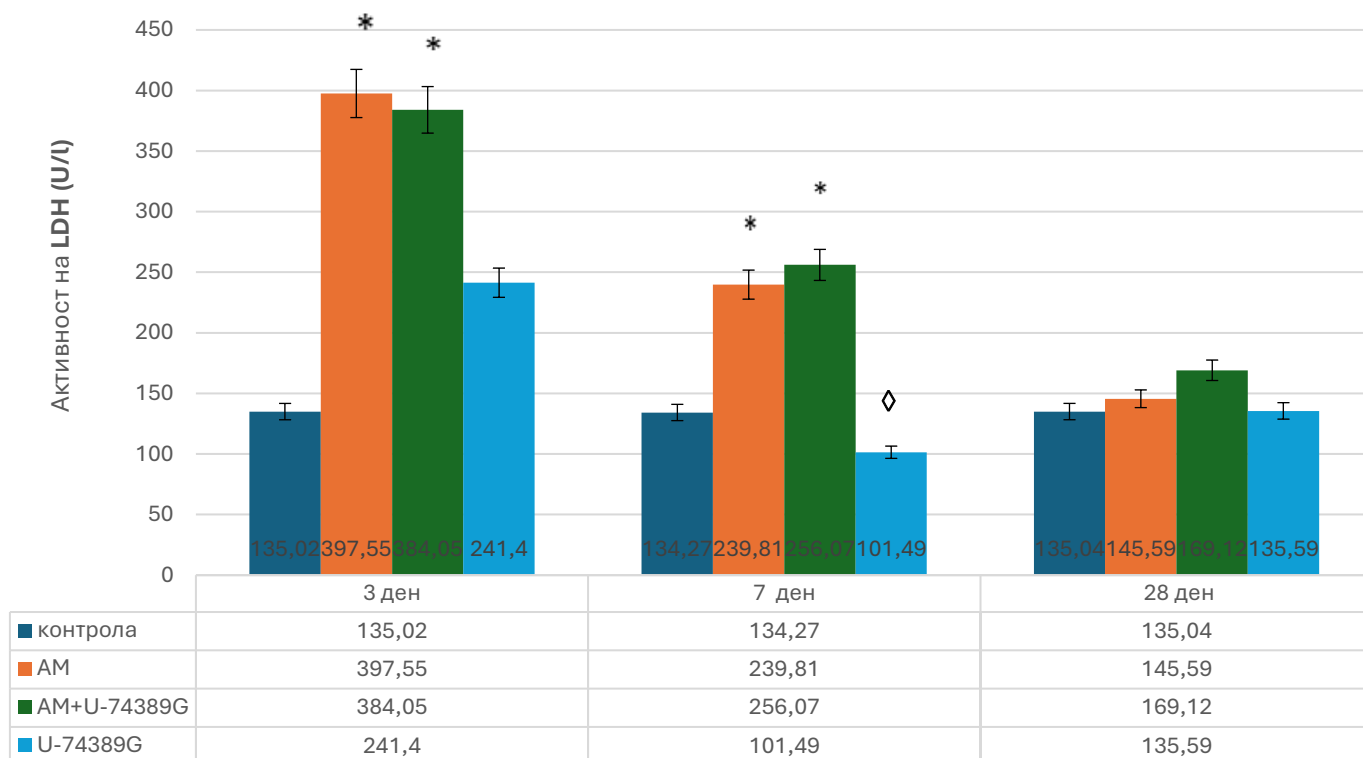
* $p < 0.05$ спрямо контролната група

Таблица 2. Ефект на U-74389G върху биохимичните параметри в БАЛТ след интратрахеално приложение на AM

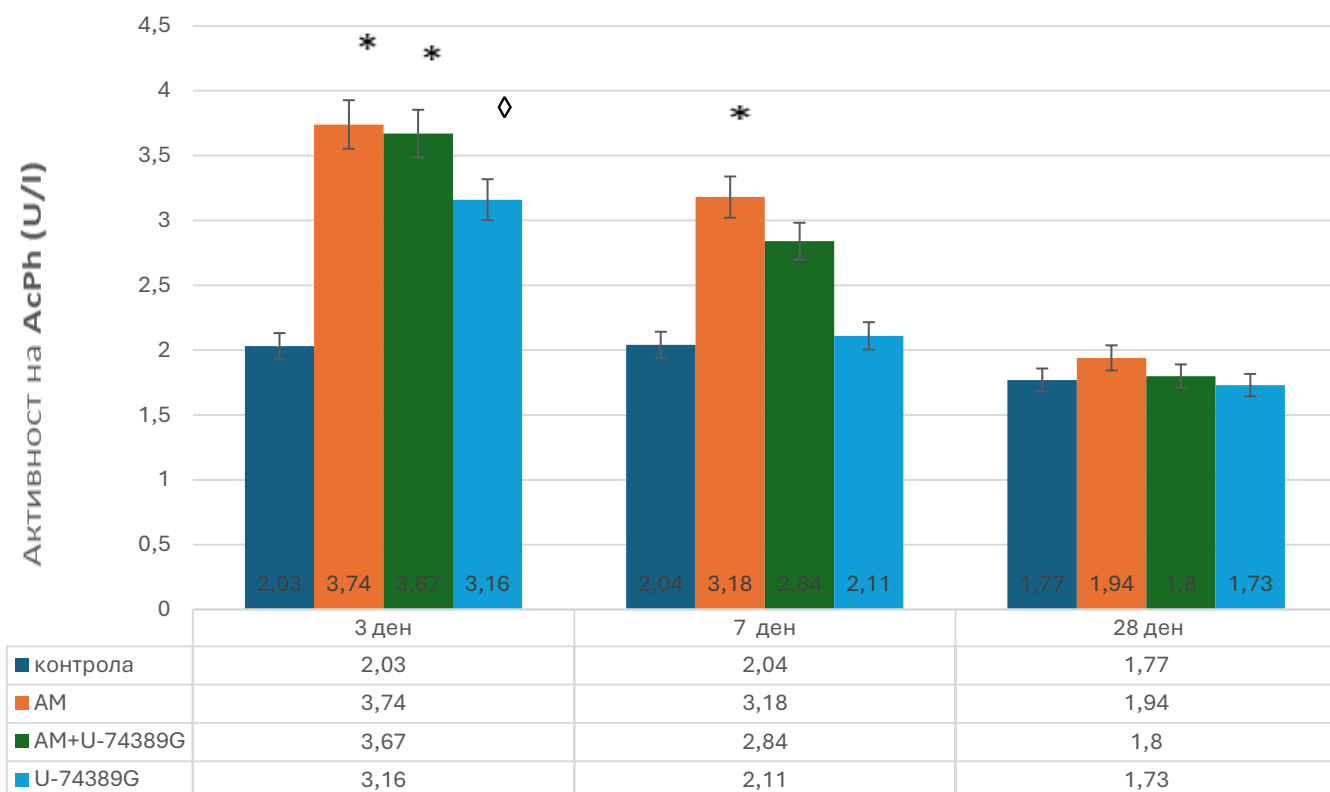
параметри /третиране	Време в дни след първоначално приложение на AM		
	Ден 3	Ден 7	Ден 28
	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM
LDH U/l			
Контрола	135.02±10.04	134.27±28.67	135.04±16.23
AM	397.55±24.36 (* $p=0.008$)	239.81±47.73 (* $p=0.048$)	145.59±20.61
AM+U-74389G	384.05±25.76 (* $p=0.009$)	256.07±45.50 (* $p=0.047$)	169.12±15.56
U-74389G	241.40±17.28	101.49±13.50 (◇ $p=0.009$)	135.59±12.55
AcPh U/l			
Контрола	2.03±0.09	2.04±0.18	1.77±0.21
AM	3.74±0.19 (* $p=0.025$)	3.18±0.32 (* $p=0.018$)	1.94±0.22
AM+U-74389G	3.67±0.23 (* $p=0.039$)	2.84±0.92	1.80±0.24
U-74389G	3.16±0.26 (◇ $p=0.097$)	2.11±0.19	1.73±0.15
AlPh U/l			
Контрола	2.02±0.24	2.01±0.35	2.01±0.13
AM	4.46±0.48 (* $p=0.025$)	4.20±0.72 (* $p=0.021$)	3.24±0.46(* $p=0.027$)
AM+U-74389G	4.50±0.61 (* $p=0.001$)	4.63±0.72 (* $p=0.018$)	3.12±0.61(* $p=0.029$)
U-74389G	2.09±0.13 (◇ $p=0.021$)	1.39±0.24 (◇ $p=0.004$)	1.84±0.30(◇ $p=0.021$)

Съкращения: LDH - лактатдехидрогеназа; AcPh - кисела фосфатаза; AlPh - алкална фосфатаза

* $p < 0.05$ спрямо контролната група, ◇ $p < 0.05$ спрямо групата с комбинация AM+U-74389G

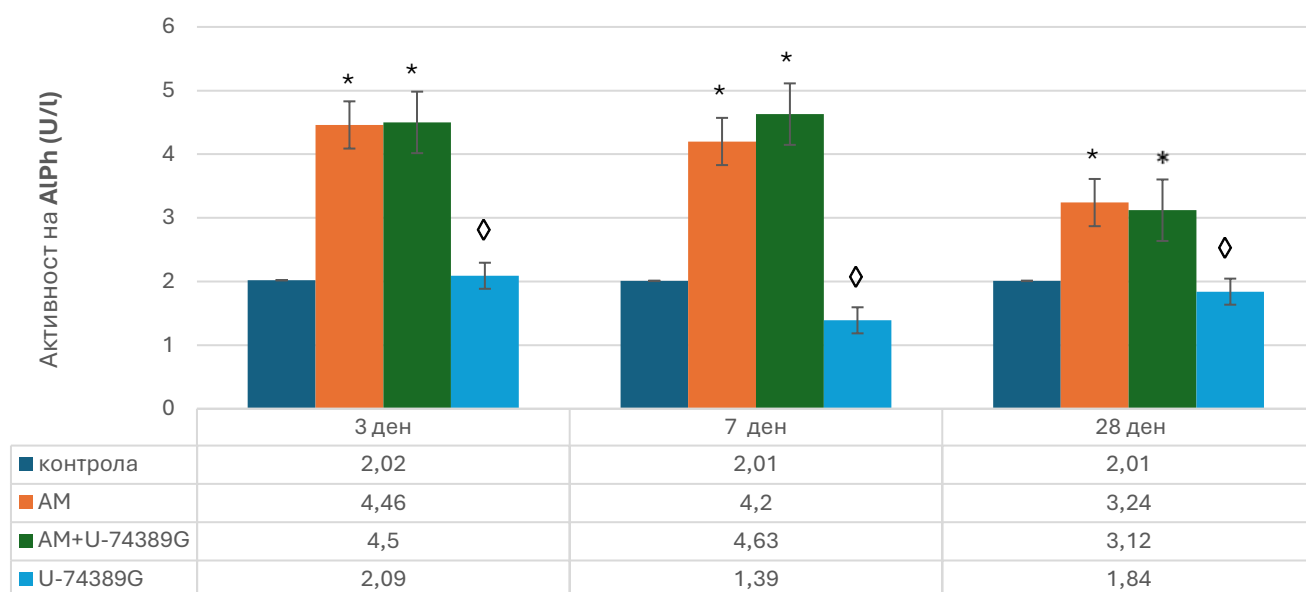


Фиг. 13. Влияние на U-74389G върху активността на **LDH** в БАЛТ след индуцирано от АМ белодробно увреждане; * $p < 0.05$ спрямо контролната група; $\diamond p < 0.05$ спрямо групата с комбинация АМ+U-74389G.



Фиг. 14. Влияние на U-74389G върху активността на **AcPh** в БАЛТ след индуцирано от АМ белодробно увреждане; * $p < 0.05$ спрямо контролната група; $\diamond p < 0.05$ спрямо групата с комбинация АМ+U-74389G.

Активността на друг ензимен маркер **алкална фосфатаза (ALPh)** в бронхоалвеоларния лаваж показва малко по-различен профил на динамика на концентрацията във времето - беше повишена на 3-тия ден, остана по-висока на 7-ия и 28-ия ден и в двете групи – с приложение на АМ, и комбинирано лечение с АМ и U-74389G. Интересна, със статистически значимо отклонение на 3, 7 и 28 ден спрямо групата с комбинация АМ+U-74389G е динамиката при групата само с приложение на U-74389G – много слабо увеличение на 3 ден, спадане на концентрацията на ALPh дори под измерената в контролната група на ден 7 и последващо повишаване, но все още със стойност под контролната група на 28 ден (фиг. 15).



Фиг. 15. Влияние на U-74389G върху активността на **ALPh** в БАЛТ след индуцирано от АМ белодробно увреждане; * $p < 0.05$ спрямо контролната група; $\diamond p < 0.05$ спрямо групата с комбинация АМ+U-74389G.

Сравнение ефектите на U-74389G и преднизолон върху маркери за възпаление и цитотоксичност в БАЛТ (бронхо-алвеоларна лаважна течност)

Сравнихме ефектите на **U-74389G** и **преднизолон (Pr)** върху ранните възпалителни промени и проявите на цитотоксичност в бронхо-алвеоларния лаважен флуид на 3 и 7 ден след интратрахеално приложение на амиодарон (Таблицы 4 и 5).

Активността на LDH, AcPh, ALPh, общо протеиново съдържание и цитологични анализи на бронхо-алвеоларна лаважна течност са изследвани на 3 и 7 ден. Повишената активност на **LDH** е маркер за повишена пропускливост на мембраната и клетъчен лизис, **AcPh** за повишена фагоцитна активност или цитотоксичност, а **ALPh** за токсично увреждане или пролиферация на пневмоцити тип 2.

На фиг. 16 е представено влиянието на преднизолон и U-74389G върху коефициента на белодробно тегло след индуцирано от АМ белодробно увреждане.

На фиг. 17 и фиг. 18 е представен ефекта на U-74389G и преднизолон върху съдържанието на протеин и общ брой клетки в бронхоалвеоларния лаваж на дни 3 и 7 след интратрахеално приложение на АМ, както и статистически значимите отклонения на показателите. Вижда се значителното редуциране в концентрацията на протеин в БАЛТ и по-слабото намаление на общия брой клетки, дължащи се на супресиране увреждането на пропускливостта на алвеоларно-капилярната бариера от преднизолон и U-74389G.

Таблица 4. Ефект на U-74389G и преднизолон (10 mg/kg) върху коефициента на тегло на белия дроб и цитологичните параметри в БАЛТ след интратрахеално приложение на АМ

Параметри/третиране	Ден 3 Mean±SEM	Ден 7 Mean±SEM
Коефициент белодробно тегло		
Контрола	0.55±0.07	0.68±0.09
АМ	1.03±0.13 (*p=0.012)	0.91±0.08
АМ+U-74389G	0.93±0.08	0.78±0.12
АМ + Pr	0.808±0.11	0.73±0.09
Протеин в БАЛТ mg/mL		
Контрола	0.167±0.03	0.201±0.02
АМ	0.88±0.09 (*p=0.03)	0.734±0.17 09 (*p=0.036)
АМ+U-74389G	0.42±0.02 (*p=0.05; ◇p=0.043)	0.65±0.02 (*p=0.05)
АМ + Pr	0.32±0.05; (◇p=0.043)	0.318±0.04 (◇p=0.043)
Общ брой клетки x10⁵/mL		
Контрола	7.43±2.99	7.43±2.99
АМ	31.62±2.96 (*p=0.001)	11.37±1.58
АМ+U-74389G	23.26±3.50 (*p=0.016; ◇p=0.02)	10.52±1.59
АМ + Pr	18.74±1.76 (*p=0.046; ◇p=0.018)	8.81±1.16
PMNs x10⁵/mL / %		
Контрола	0.32±0.02/4.3%	0.405±0.02/4.3%
АМ	22.92±1.85 (*p=0.008; ◇p=0.033)/71.0%	4.98±0.45/28.7% (*p=0.001; ◇p=0.041)
АМ+U-74389G	13.02±2.69 (*p=0.024)/52.1%	1.96±0.15/10.1% (*p=0.001; ◇p=0.01)
АМ + Pr	6.02±0.99 (◇p=0.006)/10.6%	1.15±0.02/5.3% (*p=0.05; ◇p=0.012)

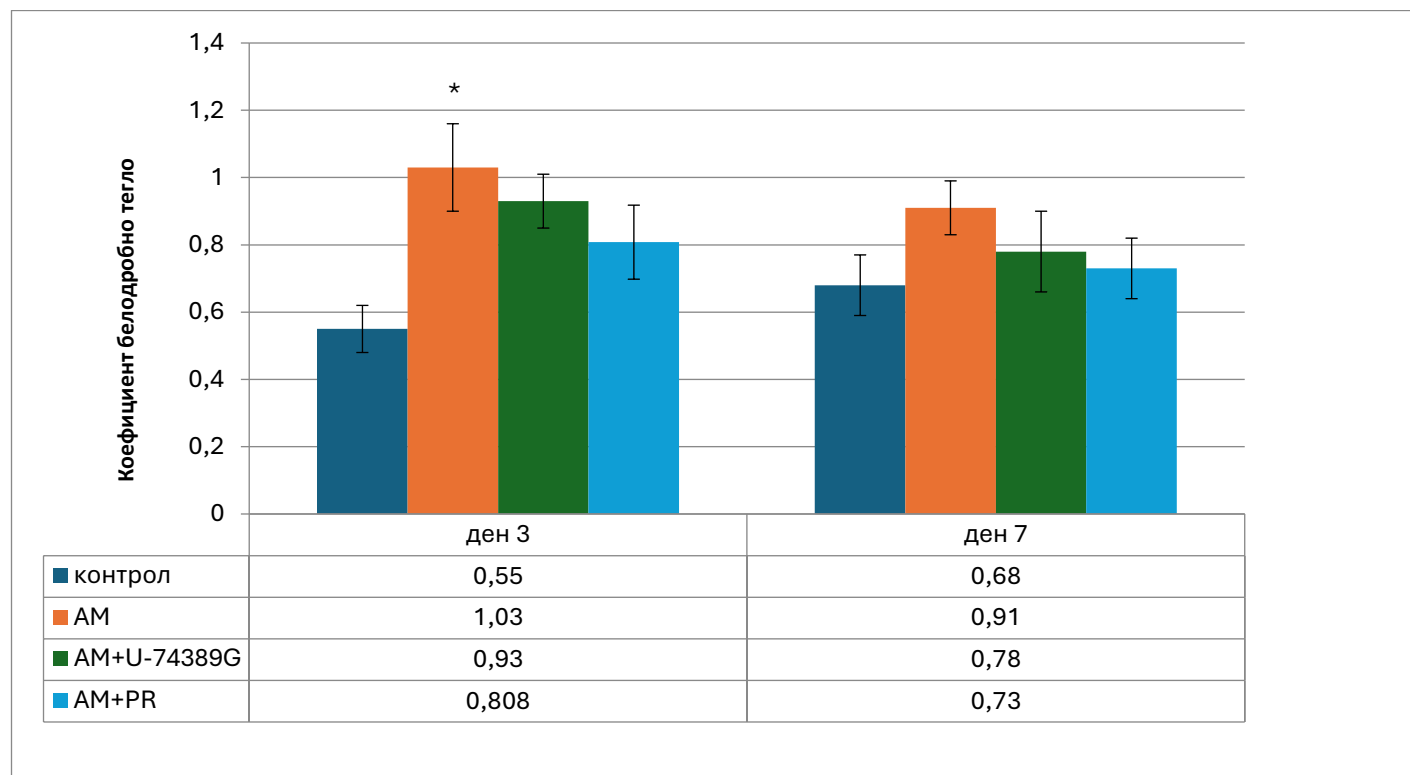
Съкращения: PMNs - полиморфонуклеарни левкоцити, Pr – преднизолон, АМ - амиодарон

*p<0.05 спрямо контролната група; ◇p<0.05 спрямо групата с АМ

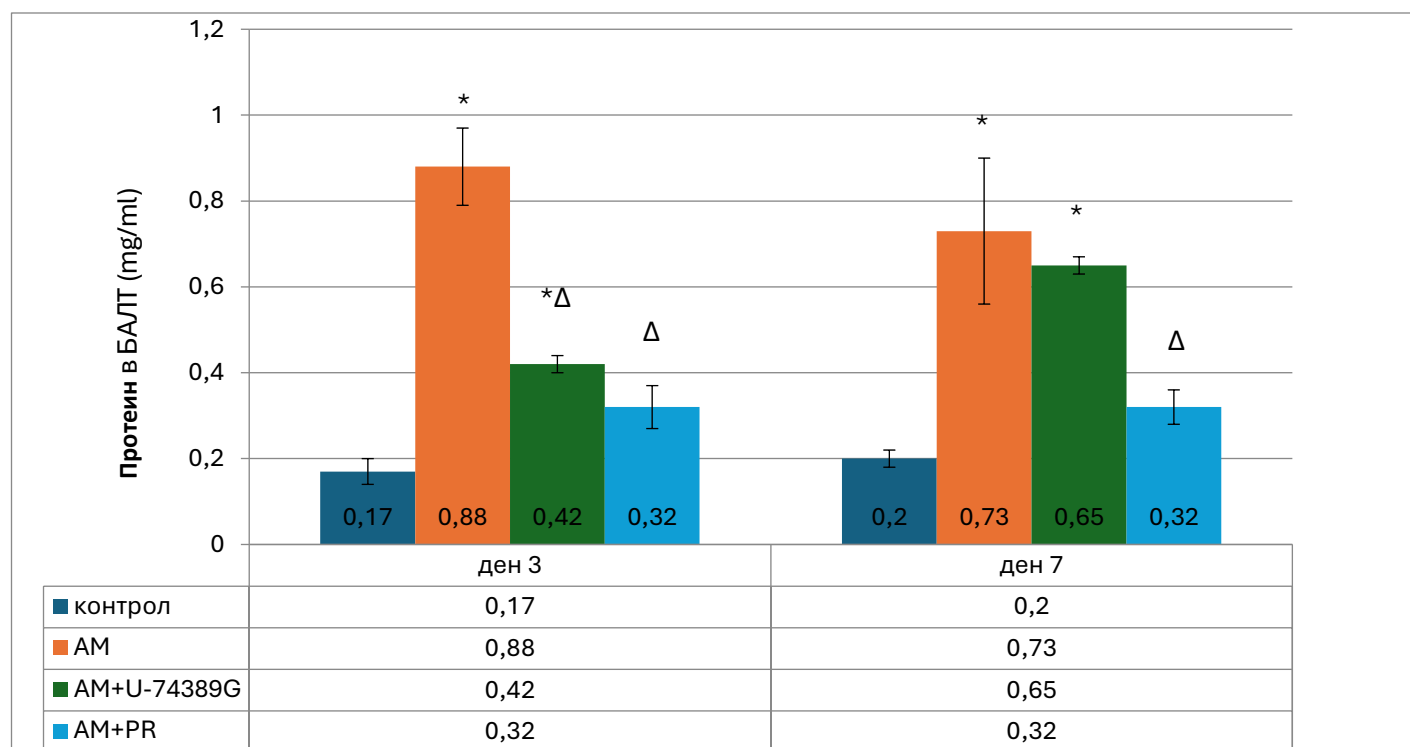
Таблица 5. Ефект на U-74389G и преднизолон (10 mg/kg) върху биохимичните параметри в бронхоалвеоларната лаважна течност след интратрахеално приложение на АМ

Параметри/третиране	Ден 3 Mean±SEM	Ден 7 Mean±SEM
LDH U/l		
Контрола	140.7±10.04	134.27±28.67
АМ	406.55±24.36 (*p=0.008)	300.01±47.73 (*p=0.048)
АМ+U-74389G	384.05±25.76 (*p=0.009)	256.07±45.50 (*p=0.047)
АМ + Pr	206.90±17.28 (◇p=0.021)	206.49±13.50 (◇p=0.009)
AcPh U/l		
Контрола	2.03±0.09	2.04±0.18
АМ	3.74±0.19 (*p=0.025)	3.18±0.32 (*p=0.018)
АМ+U-74389G	3.67±0.23 (*p=0.039)	2.84±0.92
АМ + Pr	3.00±0.26	2.11±0.19
AlPh U/l		
Контрола	2.02±0.24	2.01±0.35
АМ	4.46±0.48 (*p=0.025)	4.20±0.72 (*p=0.021)
АМ+U-74389G	4.50±0.61 (*p=0.001)	4.63±0.72 (*p=0.018)
АМ + Pr	2.09±0.13 (◇p=0.021)	1.39±0.24 (◇p=0.004)

Съкращения: LDH – лактатдехидрогеназа, AcPh - кисела фосфатаза, AlPh - алкална фосфатаза, БАЛТ - бронхоалвеоларна лаважна течност; *p< 0.05 спрямо контролната група; ◇p<0.05 спрямо групата с АМ



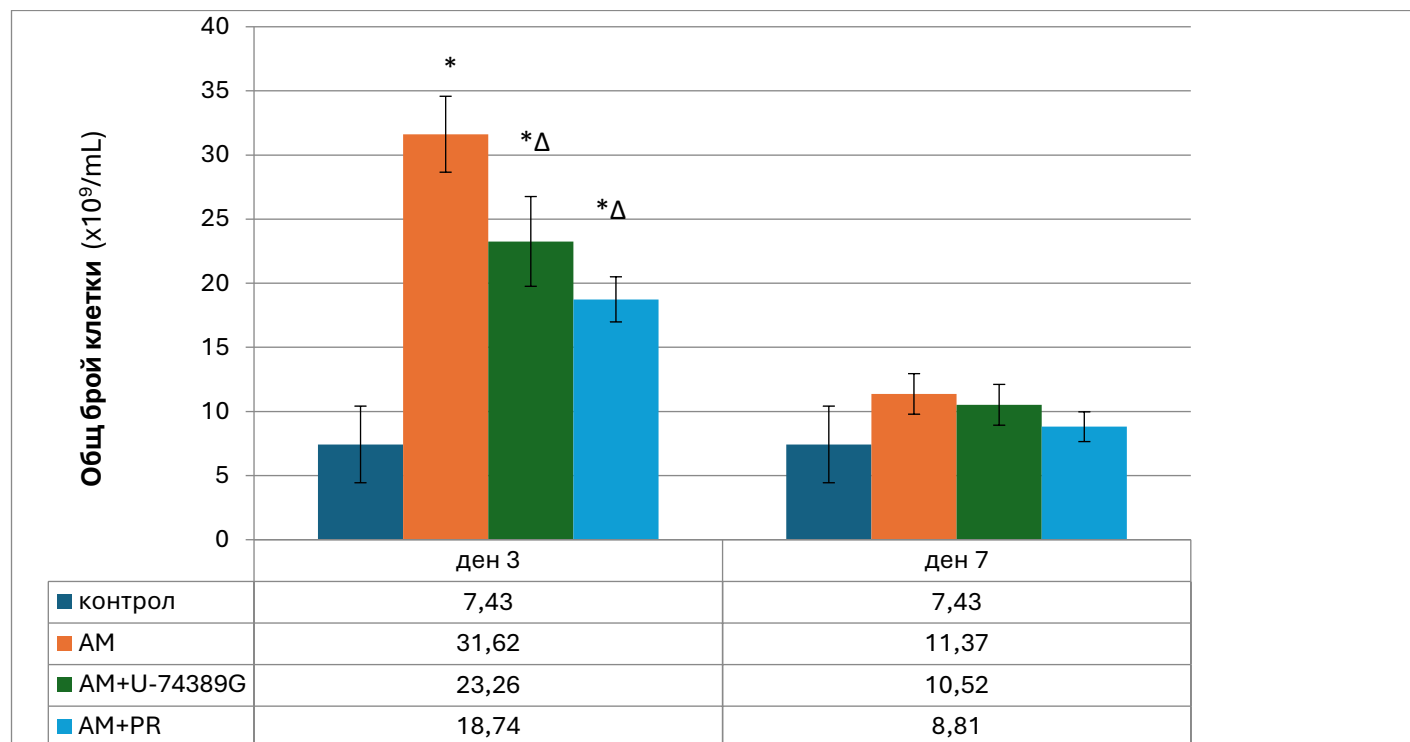
Фиг. 16. Влияние на преднизолон и U-74389G върху коефициента на белодробно тегло след индуцирано от AM белодробно увреждане; * $p < 0.05$ спрямо контролната група



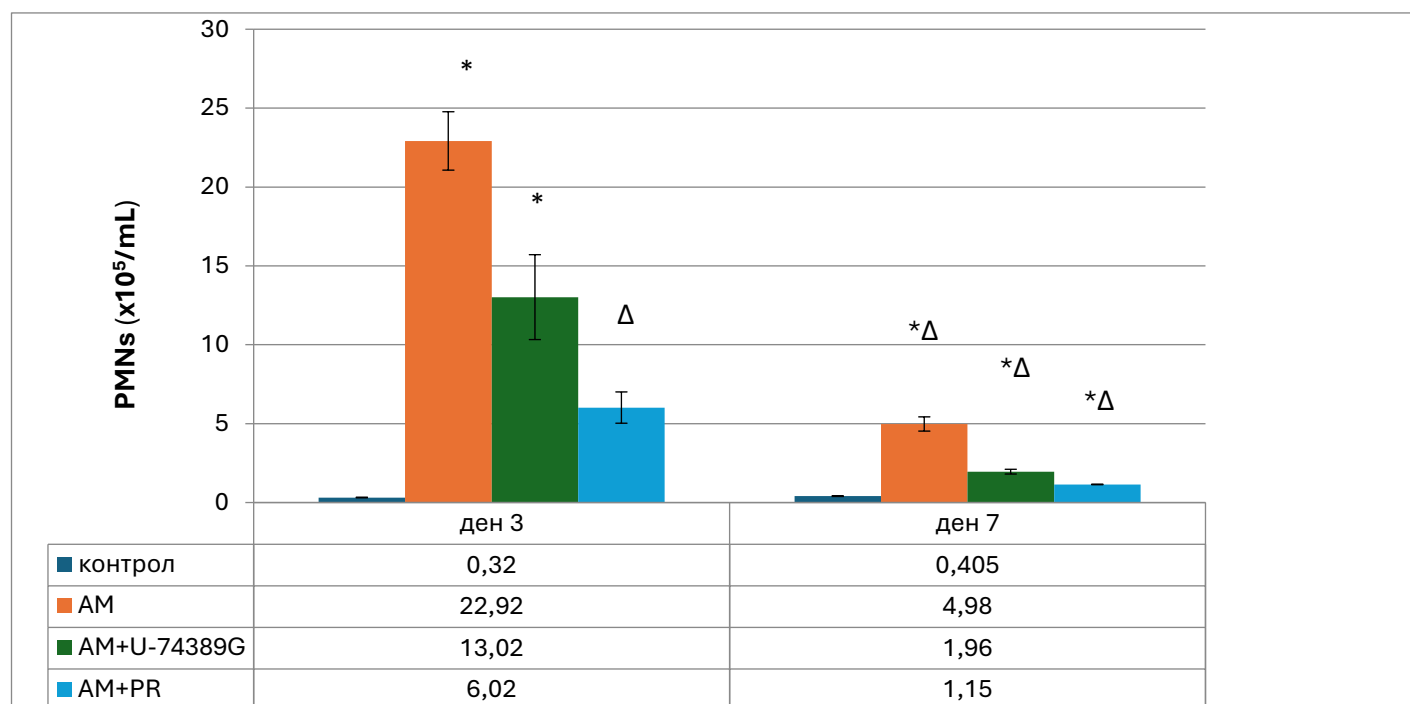
Фиг. 17. Ефект на U-74389G и преднизолон (10 mg/kg) върху съдържанието на **протеин** в бронхоалвеоларния лаваж след i.t. приложение на AM; * $p < 0.05$ спрямо контрола; Δ $p < 0.05$ спрямо AM

На фиг. 19 е показана зависимостта между приложението на U-74389G и преднизолон върху съдържанието на **полиморфонуклеарни левкоцити (PMNs)** в бронхоалвеоларния лаваж на дни 3 и 7 след интратрахеално приложение на AM, както и статистически значимите отклонения на

показателите. След първоначалното значимо увеличение на 3 ден, се забелязва спадане на количествата на полиморфонуклеарните левкоцити на 7 ден, приблизително четирикратно. Динамиката на показателя е обвързана с тенденцията за по-изразен протективен ефект на преднизолон пред този на U-74389G.



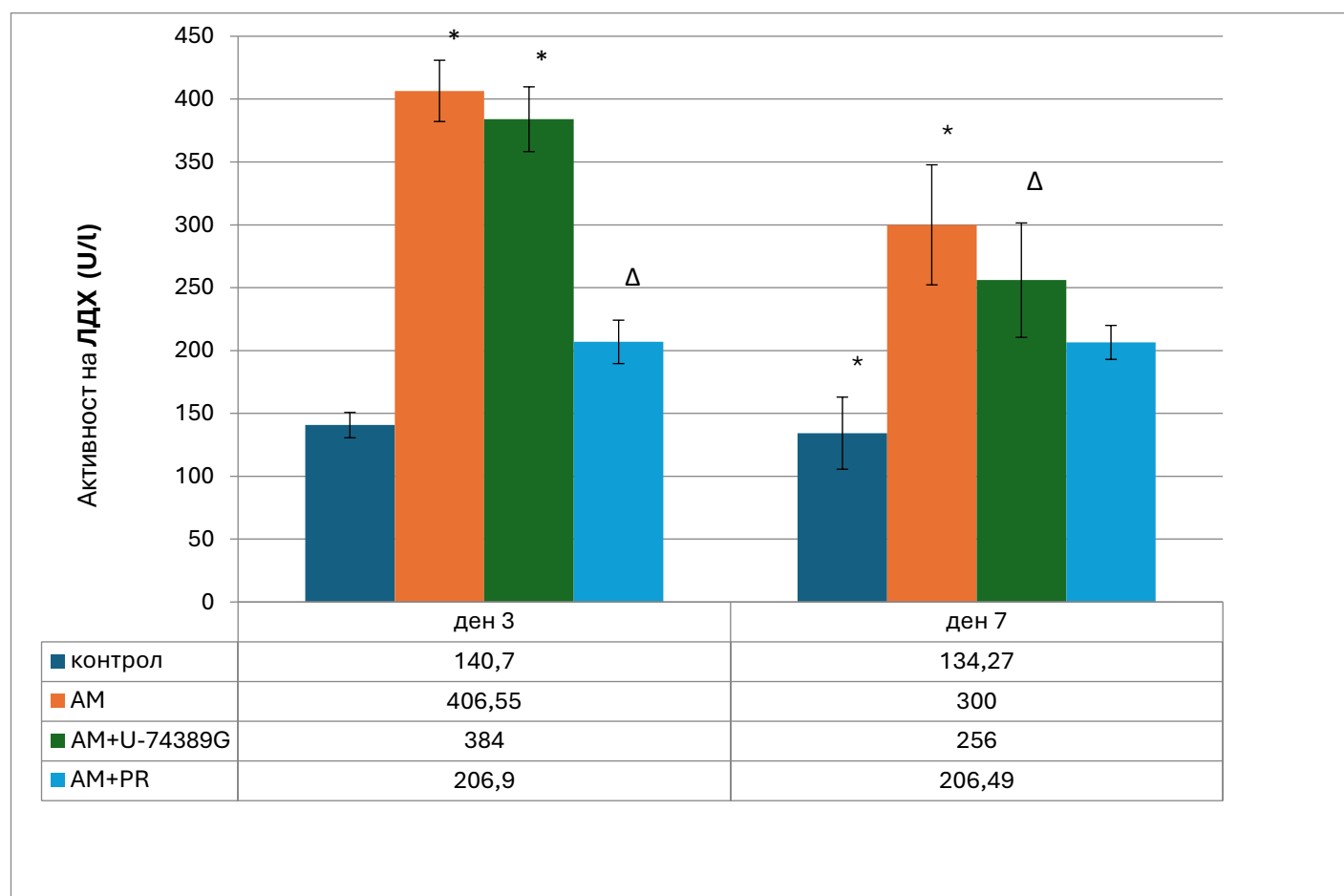
Фиг. 18. Ефект на U-74389G и преднизолон (10 mg/kg) върху **общ брой клетки** в бронхоалвеоларния лаваж след i.t. приложение на AM; * $p < 0.05$ спрямо контрола; Δ $p < 0.05$ спрямо AM



Фиг. 19. Ефект на U-74389G и преднизолон (10 mg/kg) върху **полиморфонуклеарни левкоцити (PMNs)** в бронхоалвеоларния лаваж след i.t. приложение на AM; * $p < 0.05$ спрямо контрола; Δ $p < 0.05$ спрямо AM

Фигури 20, 21 и 22 представят ефекта на U-74389G и преднизолон върху съдържанието на ензимите **LDH**, **AcPh**, **AlPh**, както и статистически значимите отклонения в показателите им в БАЛТ след интратрахеално приложение на АМ. Очаквано на 3 и 7 ден има редуциране на концентрациите на лактат дехидрогеназа и кисела фосфатаза в групите с приложение на преднизолон и U-74389G, израз на супресивния им ефект върху повишената пропускливост на мембраната и клетъчния лизис – LDH; както и повишена фагоцитна активност или унищожаване на клетки – AcPh [Dusinska M et al., 1998].

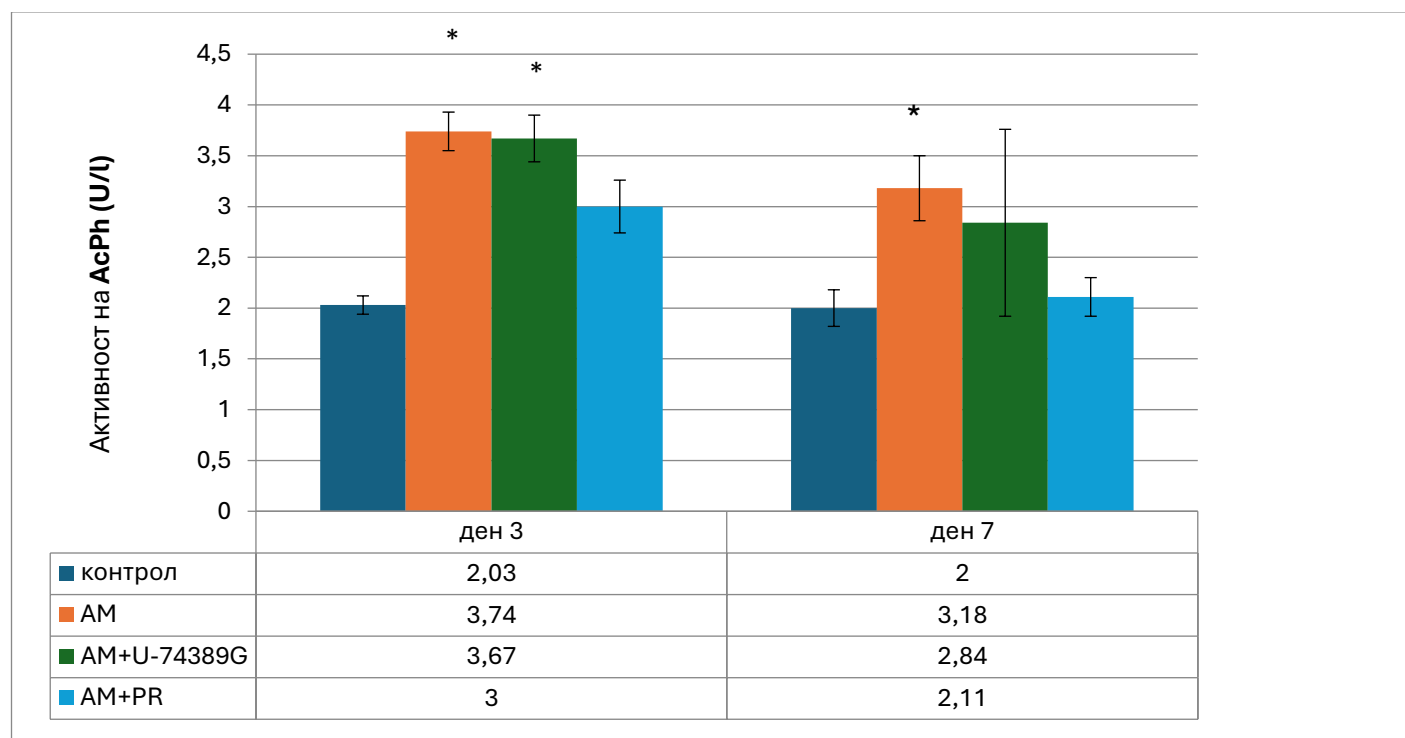
По-любопитен е случаят с концентрациите на **алкална фосфатаза (AlPh)** като израз на токсично увреждане или пролиферация на пневмоцити тип 2 [Dusinska M et al., 1998], видимо на фиг. 22. Забелязва се леко увеличение на AlPh в групата с АМ+U-74389G спрямо тази само с АМ, дължащо се евентуално на ранни токсични ефекти и пролиферация на пневмоцити тип 2, подкрепено и от нашите хистологични изследвания също показващи изразената пролиферация на пневмоцити тип 2.



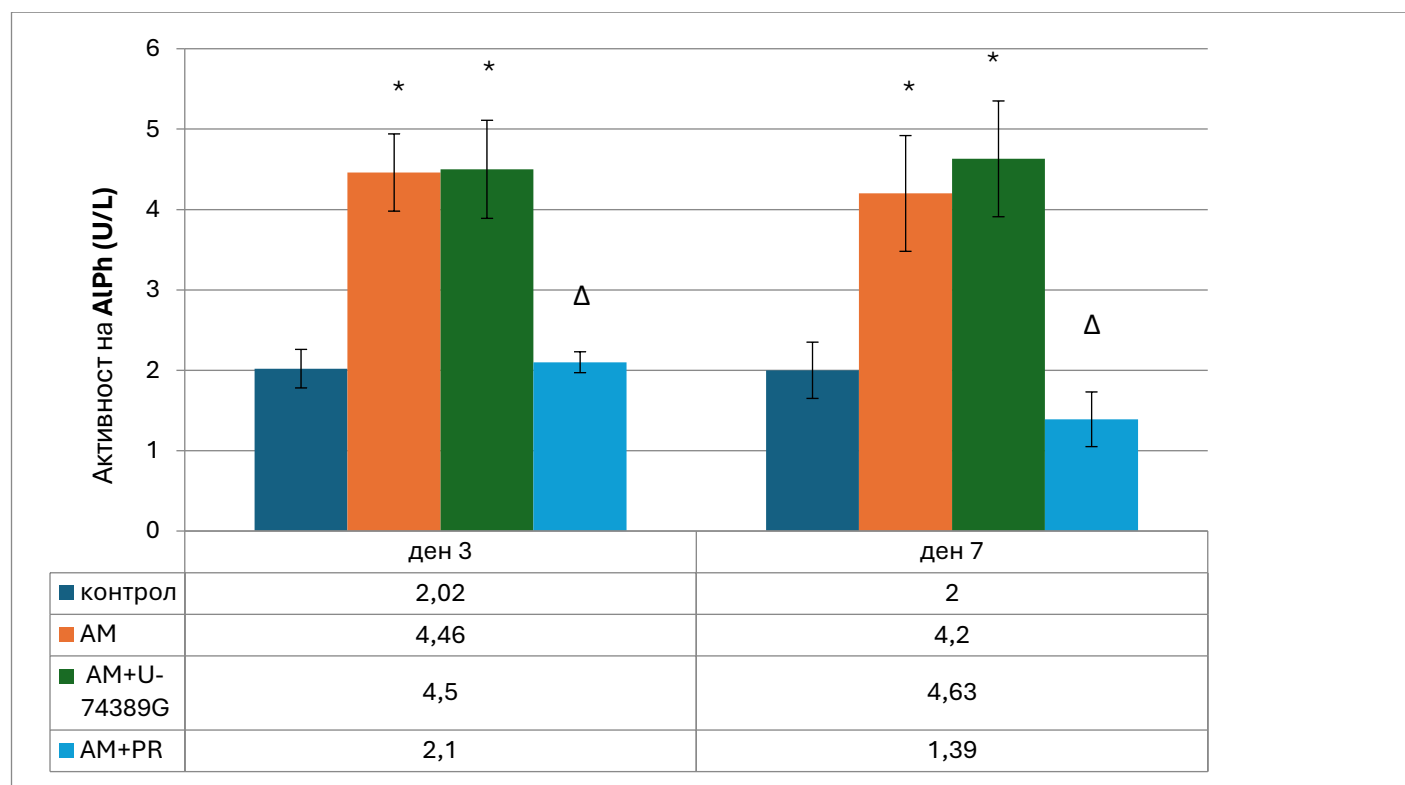
Фиг. 20. Ефект на U-74389G и преднизолон (10 mg/kg) върху активността на **лактат дехидрогеназа (LDH)** в бронхоалвеоларния лаваж след i.t. приложение на АМ; * $p < 0.05$ спрямо контрола; Δ $p < 0.05$ спрямо АМ

Резултати. Третирането с амиодарон доведе до значително повишен индекс белодробно тегло, протеиново съдържание, общ брой клетки, полиморфонуклеарни клетки, алвеоларни макрофаги и активност на LDH, AcPh и AlPh. U-74389G и преднизолон атенюират маркерите на белодробно възпаление и увреждане на алвеоларно-капилярната бариера, сравнени с групата третирана с амиодарон.

Заклучение. Нашето проучване показва, че U-74389G намалява ранното амиодарон-индуцирано белодробно възпаление, като протективният ефект е сравним с този на преднизолон.



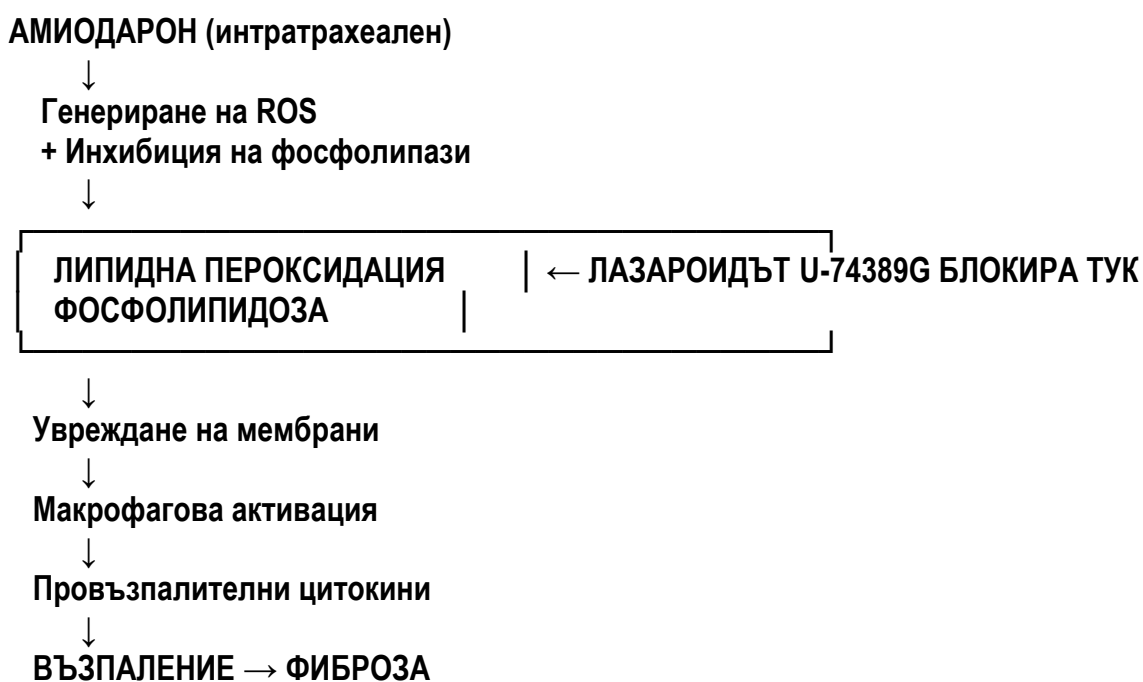
Фиг. 21. Ефект на U-74389G и преднизолон (10 mg/kg) върху активността на **кисела фосфатаза (AcPh)** в бронхоалвеоларния лаваж след i.t. приложение на AM; * $p < 0.05$ спрямо контрола



Фиг. 22. Ефект на U-74389G и преднизолон (10 mg/kg) върху активността на **алкална фосфатаза (AlPh)** в бронхоалвеоларния лаваж след i.t. приложение на AM; * $p < 0.05$ спрямо контрола; Δ $p < 0.05$ спрямо AM

Дискусия. Резултатите от нашето проучване показват, че U-74389G, антиоксидант с мощен мембранно-стабилизиращ ефект, намалява ранното индуцирано от АМ белодробно възпалително увреждане, ефект подобен на този на преднизолон. Макар че е доказано, че антиоксидантите намаляват предизвиканото от АМ белодробно възпаление и фиброза при животни, нито една от тези молекули не е показала ясна ефикасност при лечението на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност (АИБТ, AIPТ). Ние предположихме, че U-74389G може да покаже полезна активност в този модел чрез повлияване на първоначалната възпалителна фаза (фиг. 23). Избрахме U-74389G като производно на кортикостероидно ядро, заместено с антиоксидантна група. Има някои проучвания, които показват, че кортикостероидите са ефективни при животински модели на АИБТ [Reasor MJ et al., 1996], а и са препоръчителна и най-предписвана терапия при пациенти с АИБТ [Camus P et al., 2004; Wilson BD et al., 1990].

Интратрахеалното приложение на АМ е придружено от повишен коефициент на белодробно тегло приблизително 2 пъти спрямо контролната група на ден 3. Хистологичните промени показват остър перивазален и интерстициален оток, както и дегенеративни увреждания (до некроза) на пневмоцити тип 1 и 2. Комбинацията от АМ и U-74389G намалява относителната тежест на увреждане на белите дробове и клетките.



Фиг. 23. Механизъм на протективния противовъзпалителен ефект на лазароид U-74389G в модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност

Индуцираните от АМ белодробни увреждания причиняват повишена пропускливост на белодробния епител и ендотел, което води до екстравазация на плазмени протеини и натрупване на възпалителни клетки в алвеоларното пространство. АМ причинява значително увеличение (3,8 пъти) на ден 3 в съдържанието на общ белтък в безклетъчната **бронхоалвеоларна лаважна течност (БАЛТ, BALF)**. U-74389G предотвратява увреждането на пропускливостта на алвеоларно-капилярната бариера, оценено чрез нивото на протеин в БАЛТ. Съдържанието на общ белтък в групата, третирана с комбинацията АМ плюс U-74389G, е сравнимо с контролната група.

Общите клетки и различни клетъчни типове, изолирани от лаважната течност, бяха изследвани на ден 3, 7 и 28 също като маркери за увреждане на алвеоларно-капилярната бариера. Нарушената цялост на бариерата между въздуха и кръвта в алвеоларната област на белите дробове води до повишен брой клетки в БАЛТ. В нашето проучване увреждането е най-забележимо на 3-ия ден и бързо отзвучава след това. U-74389G намалява частично общия брой клетки, свързано с приложението на АМ при БАЛТ на ден 3. Този аминостероид значително намалява броя на PMN (полиморфонуклеарните неутрофили - маркер за възпаление) в промивната течност – процентът на PMN в групата на АМ е 73,0%, докато в група с комбинирано лечение с АМ и U-74389G е 52,1% ($p=0,033$). Действайки върху ранното и преходно възпаление и увреждане на алвеоларно-капилярната бариера, U-74389G може да защити по-нататъшното развитие на белодробно увреждане и фиброза. U-74389G има висок афинитет към съдовия ендотел и предпазва от увреда чрез своя мембранно стабилизиращ ефект. Абсолютният брой на алвеоларните макрофаги в групата, с приложен АМ, е леко повишен в сравнение с контролата. Активирани макрофаги и PMN могат да играят роля във възпалителната реакция чрез освобождаване на растежни фактори и цитокини, както и освобождаване на оксиданти като част от системата за защита на гостоприемника [Laskin DL et al., 1996]. U-74389G не инхибира броя на алвеоларните макрофаги след вливане на АМ на 3 и 7 дни. Зрелите макрофаги, съдържащи две или повече разделени ядра и вакуолизирана пенеста цитоплазма, са по-малко експресирани в групата с АМ и U-74389G. Цитологичните изследвания, подобно на интегралните характеристики, показват, че аминостероидът U-74389G потиска първоначалния възпалителен отговор, включително миграция и активиране на възпалителни клетки и разпадането на алвеоларно-капилярната бариера.

Повишената активност на някои ензими в БАЛТ отдавна се счита за маркер за токсични белодробни лезии: **лактат дехидрогеназа** (повишена пропускливост на мембраната и открит клетъчен лизис), **кисела фосфатаза** (повишена фагоцитна активност или унищожаване на клетки) и **алкална фосфатаза** (токсично увреждане или пролиферация на пневмоцити тип 2) [Dusinska M et al., 1998]. Интратрахеалното въвеждане на АМ в нашето проучване повишава значително активността на LDH в промивната течност на 3-ия и 7-ия ден и тези резултати потвърждават неговия пневмотоксичен ефект в ранния етап след приложението. LDH се освобождава от мъртви или увредени клетки, когато целостта на мембраната е нарушена. Нашите данни са в съответствие с проучвания, които демонстрират повишени нива на ензими при плъхове третирани с амиодарон [Taylor MD et al., 2003; Wilson BD et al., 1993]. Активността на LDH в групата с комбинирано третиране АМ плюс U-74389G беше повишена на ден 3 и 7. Нивото на AcPh беше значително по-високо в сравнение с контролната група на дни 3 и 7, но U-74389G отслаби този параметър на ден 7. Всъщност използването на U-74389G самостоятелно води до значително повишаване на активността на AcPh на ден 3. Причината за това е неясна. Възможност е активността на AcPh като маркер за повишена фагоцитна активност да се повишава, както и броят на алвеоларните макрофаги в групата с U-74389G. Активността на алкалната фосфатаза (AlPh) в бронхоалвеоларния лаваж беше повишена на 3-тия ден, остана по-висока на 7-ия и 28-ия ден и в двете групи – с приложение на АМ, и комбинирано лечение с АМ и U-74389G. Това откритие предполага ранни токсични ефекти и пролиферация на пневмоцити тип 2 по време на периода на възстановяване. Наблюдавахме освен това много слабо увеличение на AlPh в БАЛТ на групата плъхове с приложен само U-74389G на ден 3 и дори спад под нивата на контролата на ден 7, с последващо повишаване, но все още под контролата на 28 ден (фиг. 22). Нашите хистологични изследвания също показват добре изразена пролиферация на пневмоцити тип 2. U-74389G има умерена защита или не предотвратява ранното индуцирано от АМ повишаване на ензимните активности. Това беше изненадващо откритие. Тъй като U-74389G има мощна мембранно-стабилизираща и антиоксидантна активност, той би проявил защитен ефект. Известно е, че лазароидите, в това число и U-74389G, имат голям обем на разпределение в стационарно състояние (4,9 L/kg) и добро проникване в тъканите, включително белите дробове [Wilson JS et al., 1991]. Протоколът приет за това проучване, изисква предварително третиране с U-74389G (2 часа преди

инстилация АМ), за да се осигури достатъчна концентрация на аминостероида в белодробния паренхим. Едно възможно обяснение на нашия резултат е, че U-74389G не е достигнал оптимална белодробна концентрация за предотвратяване на ранен АМ цитотоксичен ефект. Според Taylor et al. директен токсичен ефект на АМ върху епителните клетки настъпва скоро след i.t. АМ приложение – LHD активността е значително повишена 15 минути след АМ i.t. [Taylor MD et al., 2003]. От друга страна се съобщава, че същата доза и начин на приложение на аминостероида (преди и след това два пъти дневно след агресивния агент) ограничават увреждането на ЦНС [Vignes JR et al., 2006] и острия некротизиращ панкреатит [Alhan E et al., 2006]. Но белите дробове са уникални, защото имат голяма епителна повърхност, която е изложена на риск от увреди медиани от оксиданти. [Comhair SAA et al., 2002]. Трахеобронхиалното дърво и алвеоларното пространство са изложени на реактивни оксидиращи видове и белите дробове се нуждаят от допълнителни антиоксидантни ресурси, за да предотвратят окислителни увреждания от въздушно-преносими нокс.

Нашите проучвания показват, че U-74389G има защитен ефект срещу ранен възпалителен отговор след интратрахеално вливане на АМ. Този лазароид инхибира индуцираното от АМ повишаване на възпалителната активност в белия дроб, което може да е свързано с неговите мембранно-стабилизиращи и антиоксидантни свойства [Hall ED et al., 1987]. Доказано е също, че аминостероидите предотвратяват освобождаването на метаболити на арахидоновата киселина [Braugher JM et al., 1988; Richards IM et al., 1992]. Оксидативният стрес може да е отговорен за АИБТ, което се поддържа от повишеното производство на супероксидни аниони от стимулирани алвеоларни макрофаги, получени при плъхове, третирани с АМ [Vereckei A et al., 1993]. Някои проучвания разкриват, че АМ се метаболизира до арилов радикал, който може да доведе и до други реактивни кислородни видове [Taylor MD et al., 2003; Nicolescu AC et al., 2007]. Лазароидите неутрализират свободните кислородни радикали и са много ефективни при инхибиране на зависимата от желязо липидна пероксидация, подобно на витамин Е [Hall E D et al., 1995; Braugher JM et al., 1988; Clark WM et al., 1995], предотвратяват ранни, но не и късни стадии на индуцирано от кислород увреждане на клетките [Huang H et al., 2001].

U-74389G има мощни стабилизиращи ефекти върху клетъчните мембрани [Jacobsen EJ et al., 1990; Clark WM et al., 1995]. Поради своята липофилност този 21-аминостероид има висок афинитет към липидния двоен слой и е включен в него, като заема строго определена позиция и ориентация [Raub TJ et al., 1993]. Взаимодействието между пиперазиновите азотни и фосфатни групи на липидната мембрана повишава нейната устойчивост, ограничава движението на пероксилните радикали в мембраната, взаимодействието им с мастни киселини и пероксидното увреждане [Hall ED et al., 1987]. В заключение, лазароидът U-74389G, приложен преди и след АМ интратрахеална инстилация, има защитен ефект върху ранния възпалителен отговор, оценен чрез цитологични и биохимични маркери в бронхоалвеоларна лаважна течност.

1.3.Ефекти на U-74389G върху маркери на антиоксидантната защитна система, липидна пероксидация и белодробна фиброза в белодробен хомогенат

Таблица 6 представя активността на антиоксидантните ензими в белодробния хомогенат, изразени в U/g тъкан или в mcat/g, съответстващо на публикации в международни издания. Активността на **супероксид дисмутаза (SOD)** в сравнение с контролната група намалява значително на 3-тия ден

(67% спрямо контролата) в групата с приложение на AM. SOD активността не се променя значително при комбинирано лечение AM+U-74389G (група 3) в сравнение с група 2 (AM група) (фиг. 24).

Каталазната (CAT) активност се увеличава значително на 3-тия ден в групи 2 и 3 в сравнение с контролните животни. CAT активността на 3-тия ден се увеличава по-малко в групата AM и U-74389G (115% спрямо контролата), отколкото в групата с AM (123% спрямо контролата) (фиг. 25).

Глутатион пероксидазната (GP) активност намалява значително и в двете експериментални групи (2 и 3) на 3-тия и 7-мия ден в сравнение с контролната група. Намаляването на ензимната активност в група 3 (AM и U-74389G) е незначително по-малко от това в група 2 (AM) в същите времеви точки. Най-слабо е намалението на глутатион пероксидазната активност в групата с изолирано приложение на U-74389G (фиг. 26).

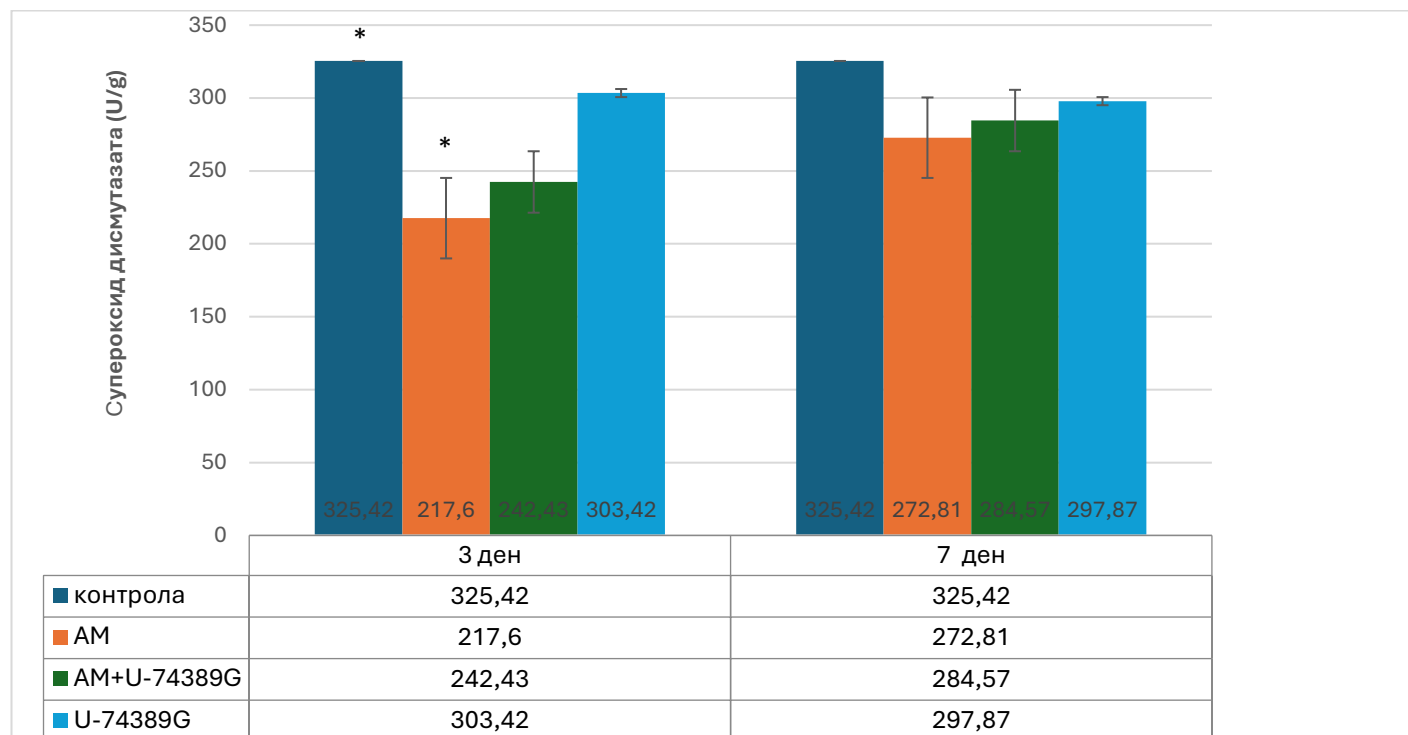
Концентрациите на **хидропероксид** (Фиг. 27) са значително повишени в плазмата на плъхове, третирани с амиодарон (група 2) на 7-ми ден, когато достигат 146% в сравнение с контролната група ($p = 0,03$). Комбинацията от амиодарон и U-74389G (група 3) също повишава този маркер, но той остава значително по-нисък в сравнение с група 2 в същия времеви момент ($p = 0,046$).

Измерването на съдържанието на **малондиалдехид (MDA)** (Фиг. 28) в белодробния хомогенат показва подобен модел на промяна. Съдържанието на MDA на 7-ия ден се увеличава по-отчетливо само в групата, третирана с амиодарон (169%) в сравнение с контролната група ($p = 0,03$). Комбинираното лечение с амиодарон и лазароид намали значително този индекс в същия ден в сравнение с група AM ($p = 0,037$).

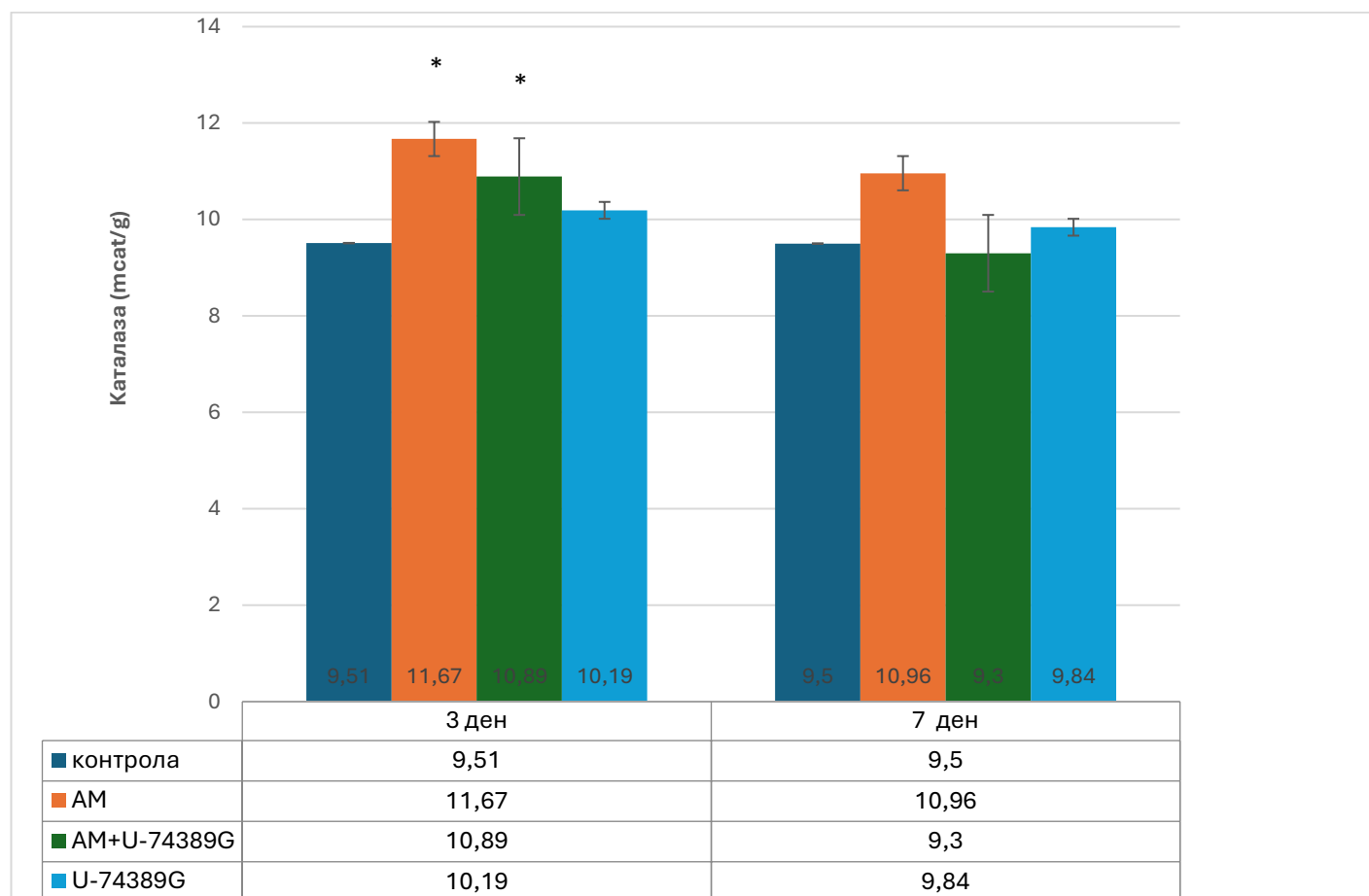
Таблица 6. **Супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GP)** активност в белодробен хомогенат на ден 3 и 7 след интратрахеално приложение на амиодарон (AM)

параметър групи	SOD		CAT		GP	
	ден 3	ден 7	ден 3	ден 7	ден 3	ден 7
	U/g mean±SEM	U/g mean±SEM	mcatal/g mean±SEM	mcatal/g mean±SEM	U/g mean±SEM	U/g mean±SEM
Контрола (група 1)	325.42±54.18	325.42±54.18	9.51±0.47	9.50±0.47	60.12±5.03	62.16±7.30
AM (група 2)	217.60±51.39*	272.81±26.79	11.67±0.22*	10.96±0.46	43.21±2.78	38.84±2.03*
AM+U-74389G (група 3)	242.43±55.76*	284.57±45.68	10.89±0.47*	9.30±0.82	44.86±4.75	40.08±3.09*
U-74389G (група 4)	303.42±50.86	297.87±44.63	10.19±0.22	9.84±0.33	56.39±5.33	50.92±4.03

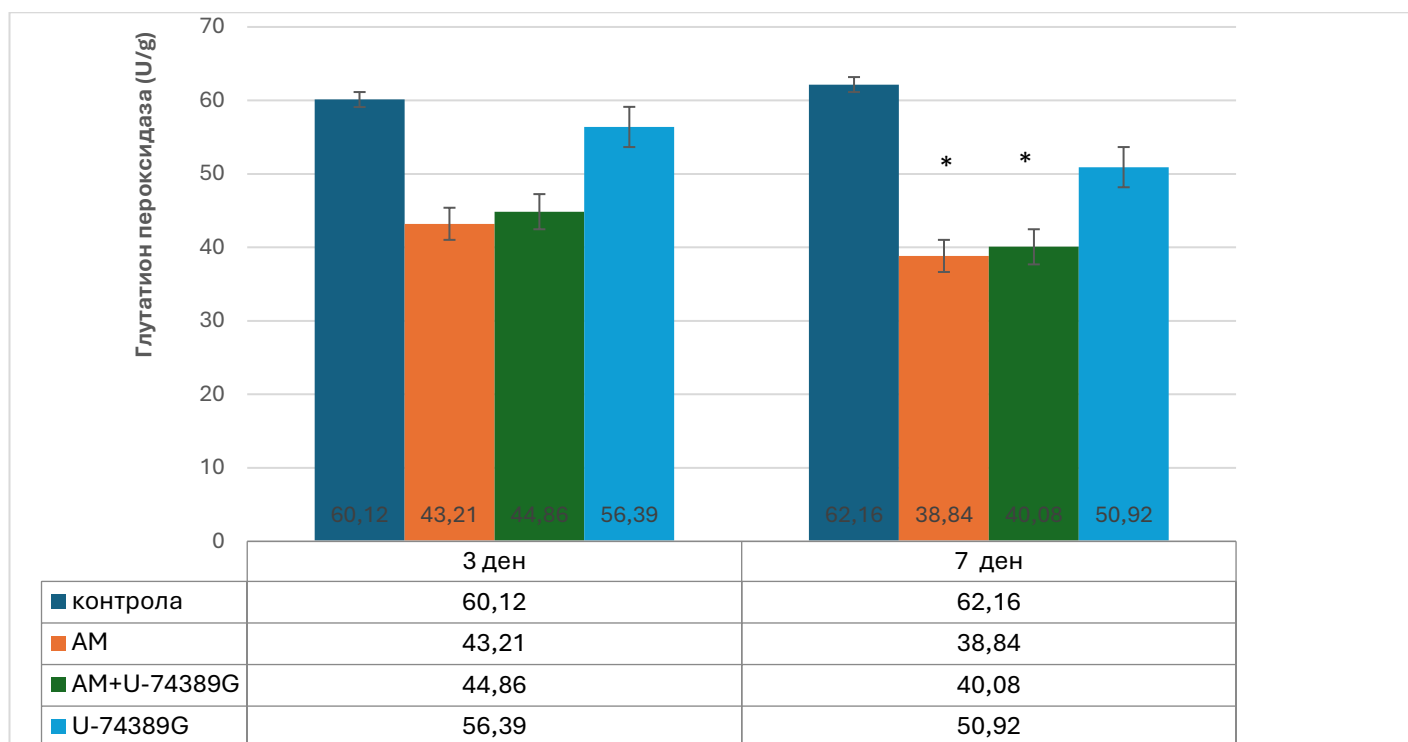
* $P < 0.05$ спрямо контролната група



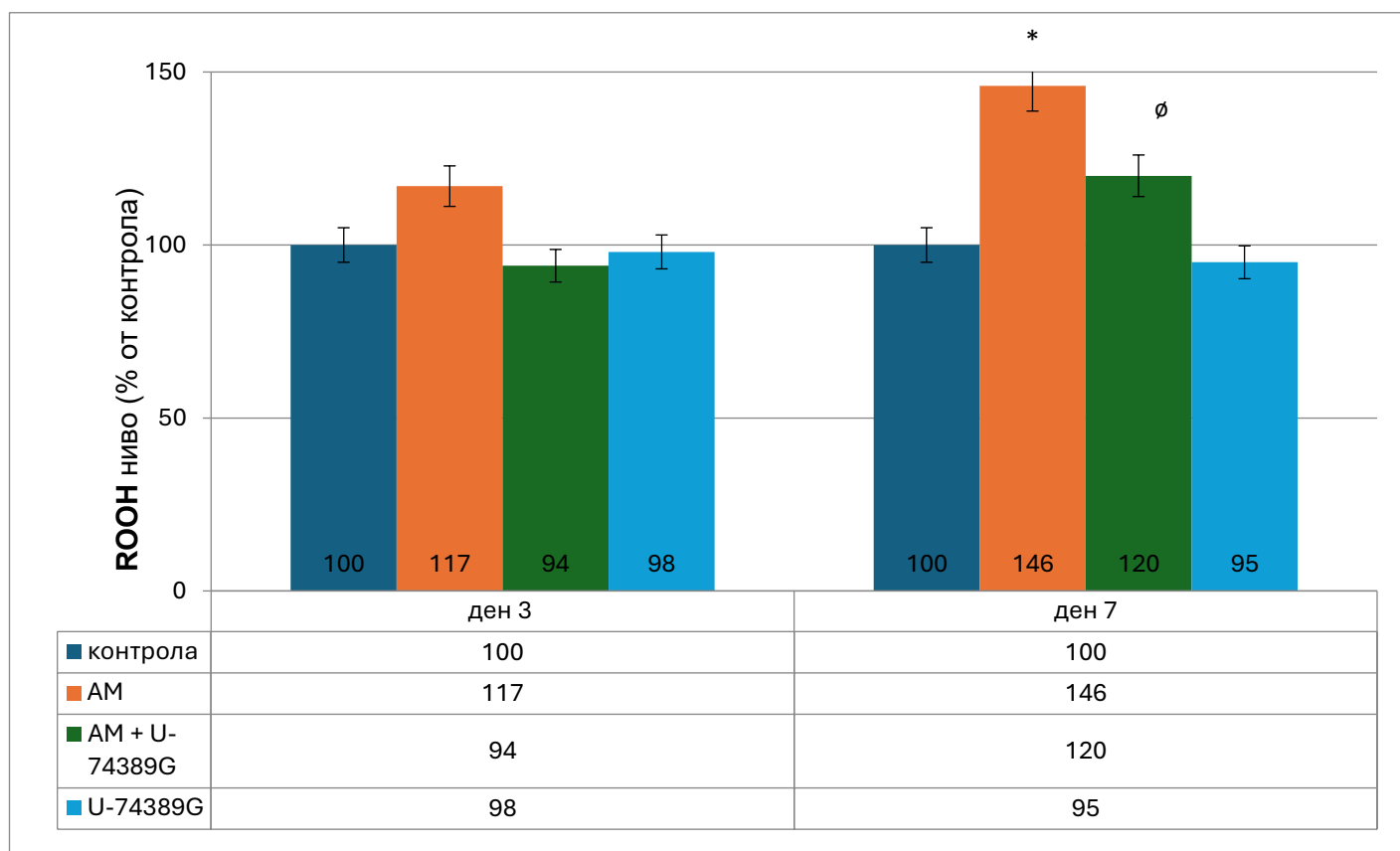
Фиг. 24. Ефект на U-74389G върху активността на **супероксид дисмутаза (SOD)** в белодробния хомогенат след i.t. приложение на AM; * $p < 0.05$ спрямо контрола



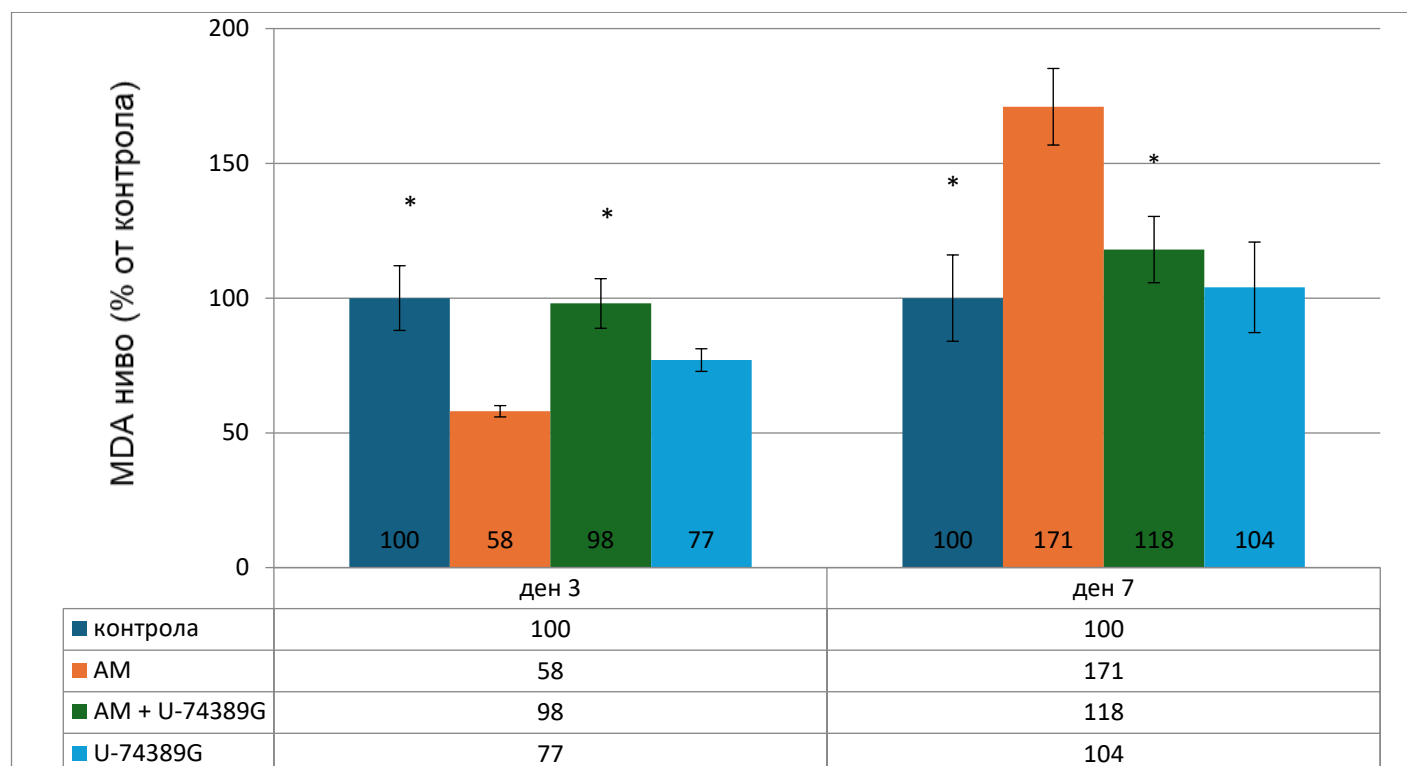
Фиг. 25. Ефект на U-74389G върху **каталазната (CAT)** активност в белодробния хомогенат след i.t. приложение на AM; * $p < 0.05$ спрямо контрола



Фиг. 26. Ефект на U-74389G върху **глутатион пероксидазната (GPX)** активност в белодробния хомогенат след i.t. приложение на AM; * $p < 0.05$ спрямо контрола



Фиг. 27. Концентрации на **хидропероксид** в плазмата за дни 3 и 7 след интратрахеално приложение на амиодарон. AM – амиодарон, ROOH – хидропероксид; * $p < 0.05$ спрямо контрола; ø $p > 0.05$ спрямо AM



Фиг. 28. Съдържание на **малондиалдехид** в белодробен хомогенат на дни 3 и 7 след интратрахеална апликация на амиодарон. AM – амиодарон, MDA – малондиалдехид;

* $p < 0.05$ спрямо AM

Биохимични анализи на маркери за белодробна фиброза в белодробен хомогенат.

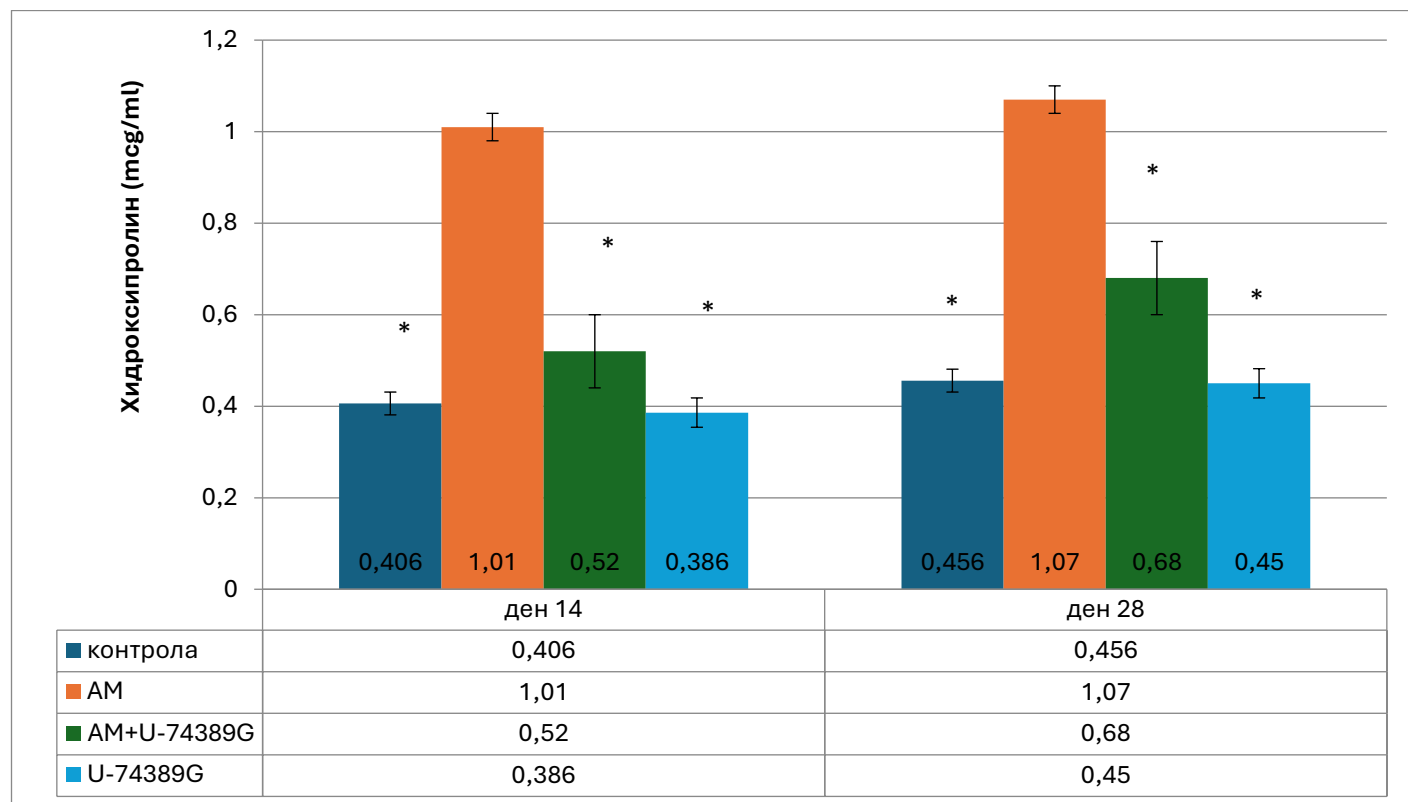
Пулмонарната фиброза се оцени чрез измерване на съдържанието на хидроксипролин (HP) и колаген в белодробен хомогенат на 14 и 28 ден след приложението на амиодарон (фигури 29, 30 и 31).

Изолираното приложение на амиодарон (група 2) значително увеличи съдържанието на **хидроксипролин (HP)** (Фиг. 30) на 14-ия ден до 249% спрямо контролата и на 28-ия ден до 235%, съответно. Лазароидът U-74389G в комбинация с амиодарон (група 3) значително намали този маркер ($0,68 \pm 0,08$ mcg/ml в белодробен хомогенат) на 28 ден, сравнено с група 2 - само амиодарон ($1,07 \pm 0,17$ mcg/ml в белодробен хомогенат). Резултатите в група 4 (лекувано само с U-74389G) бяха сравними с тези на контролната група.

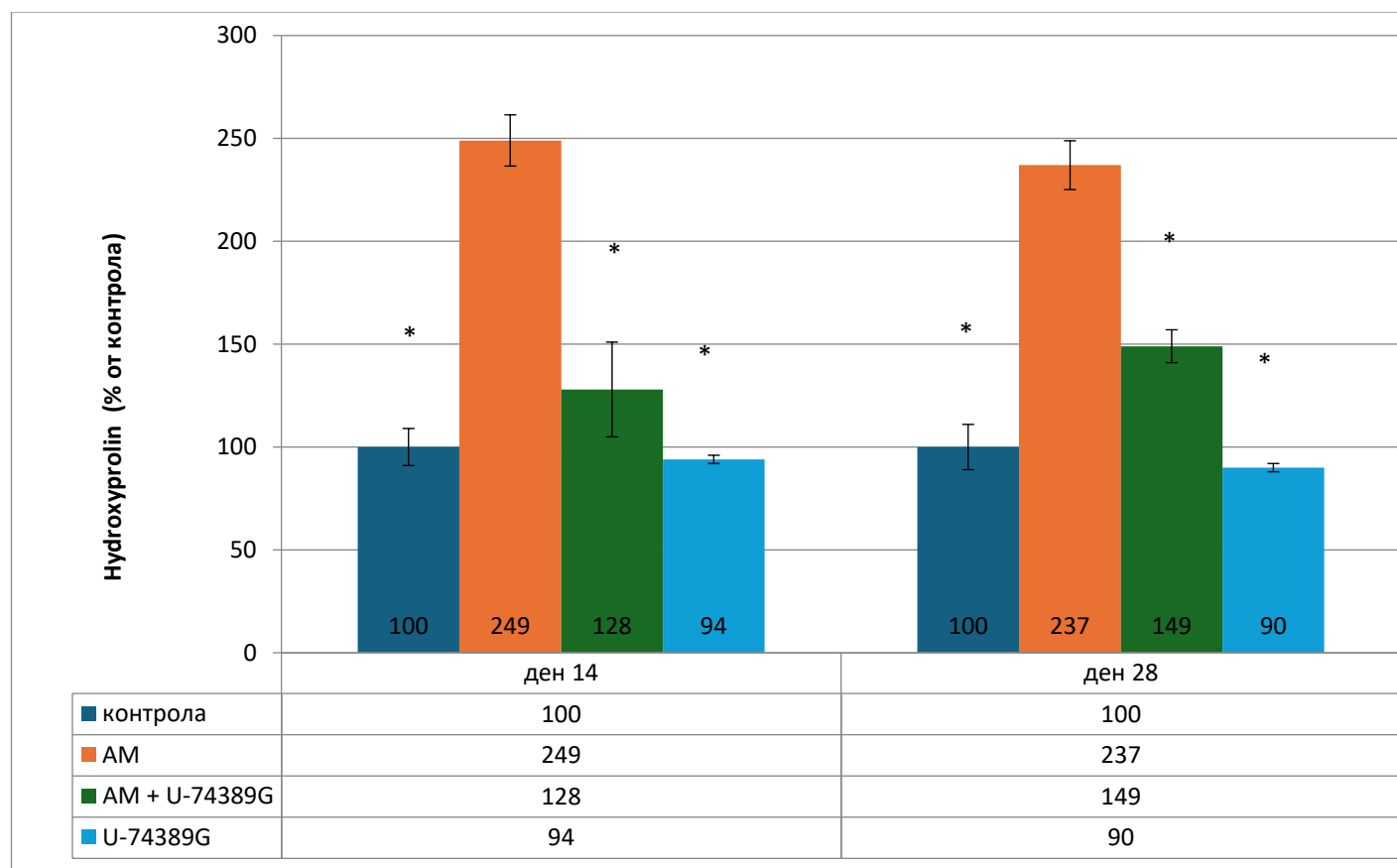
На фиг. 31 е показано нивото на **колагена** в белодробния хомогенат на 28 ден. Колагенът в групата, третирана с амиодарон ($40,67 \pm 3,87$ mcg/ml) значително нараства спрямо контролата ($30,07 \pm 2,11$ mcg/ml), докато, поради протективния ефект, в групата, третирана с AM + U-74389G, колагенът дори се понижава умерено ($26,93 \pm 2,1$ mcg/ml).

Таблица 7. Стойности на **хидроксипролин** (на 14 и 28 ден) и **колаген** (на 28 ден) в белодробен хомогенат (LH) след интратрахеална апликация на амиодарон.

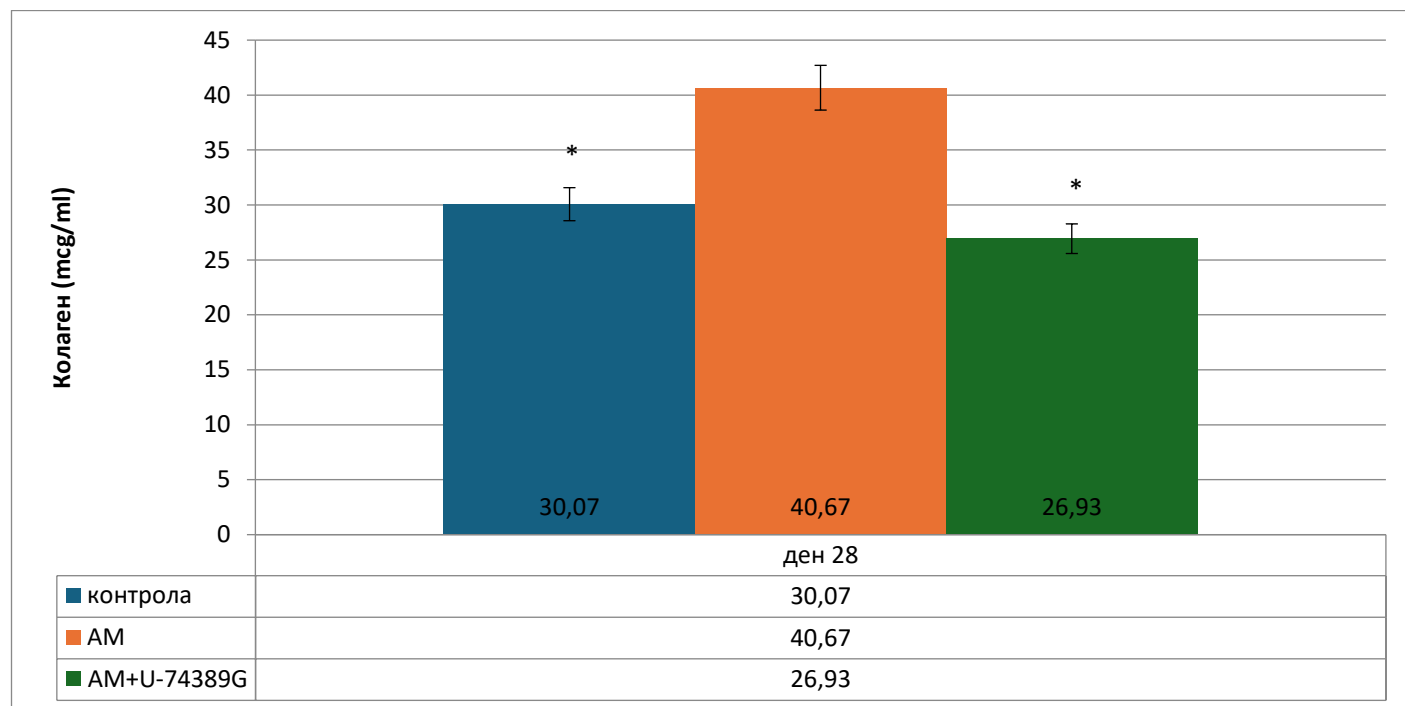
Група	Хидроксипролин 14 ден mcg/ml LH	Хидроксипролин 28 ден mcg/ml LH	Колаген 28 ден mcg/ml LH
Контрола	$0,406 \pm 0,03$	$0,456 \pm 0,017$	$30,07 \pm 2,11$
Амиодарон	$1,01 \pm 0,07$	$1,07 \pm 0,17$	$40,67 \pm 3,87$
AM + U-74389G	$0,52 \pm 0,06$	$0,68 \pm 0,08$	$26,93 \pm 2,1$
U-74389G	$0,386 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,023$	-



Фиг. 29. Съдържание (концентрация) на **хидроксипролин (HP)** mcg/ml в белодробен хомогенат на дни 14 и 28 след интратрахеална апликация на амиодарон (AM); * $p < 0.05$ спрямо AM



Фиг. 30. Процентно съдържание на **хидроксипролин (HP)** в белодробен хомогенат на дни 14 и 28 след интратрахеална апликация на амиодарон (AM); * $p < 0.05$ спрямо AM групата

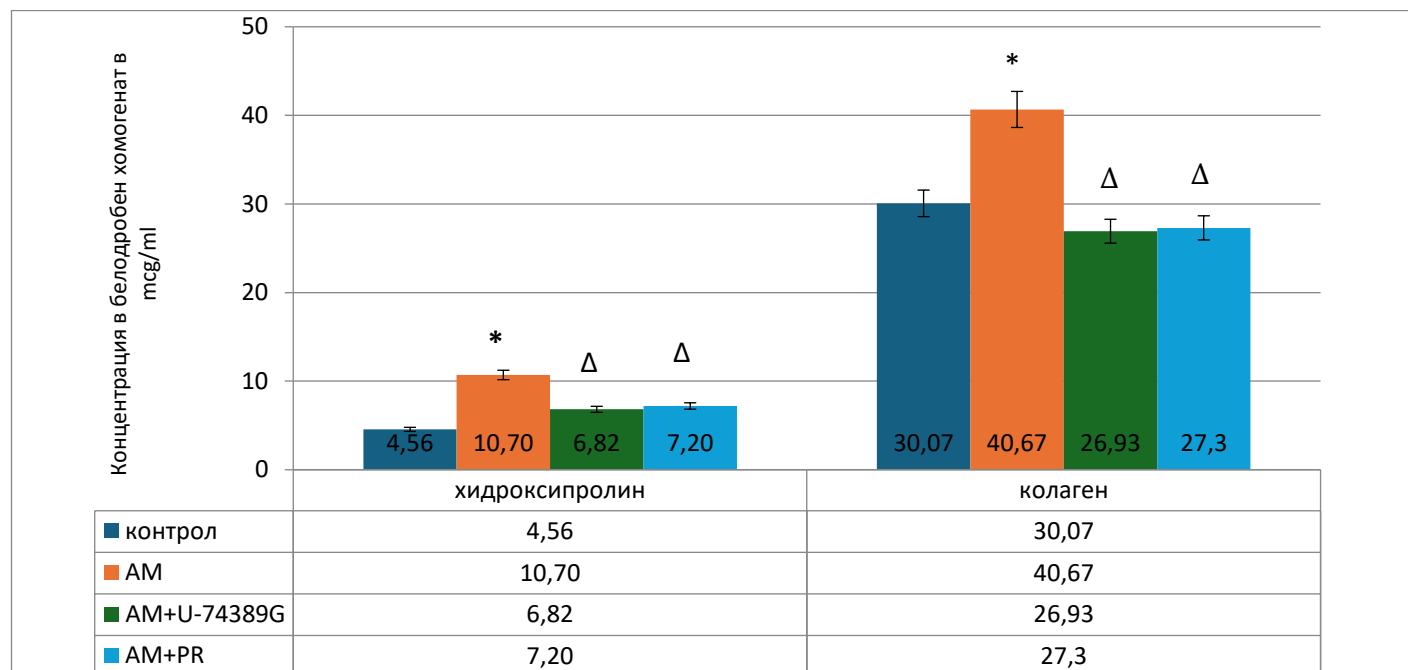


Фиг. 31. Съдържание на **колаген** mcg/ml в белодробен хомогенат на ден 28 след интратрахеална апликация на амиодарон (AM); * $p < 0.05$ спрямо AM

Сравнение ефектите на U-74389G и преднизолон върху маркери на антиоксидантната защитна система и белодробна фиброза в белодробен хомогенат (LH).

Сравнихме ефектите на U-74389G и преднизолон върху маркери на белодробна фиброза в белодробен хомогенат. Изследвахме 72 плъха Wistar, разделени в четири групи: 1 – **контрола**; 2 – с приложен интратрахеално **амиодарон**; 3 – третирани с **амиодарон и U-74389G**; 4 – с приложени **амиодарон и преднизолон**. Амиодарон беше приложен интратрахеално (6.25 mg/kg; 3.125 mg/ml) на дни 0 и 2. Интраперитонеално приложихме U-74389G - 15 mg/kg/d и преднизолон - 10 mg/kg/d, трикратно – два часа преди интратрахеалната апликация на AM, както и на дни 0 и 2 след AM. Белодробната фиброза беше оценена чрез съдържанието на хидроксипролин и колаген в белодробен хомогенат на 28 ден след приложение на амиодарон (фиг. 32). Съдържание на **хидроксипролин** в белодробен хомогенат на ден 28 след интратрахеално приложение на AM беше както следва: контролна група – 4.56 mcg/ml, AM група – 10.7 mcg/ml, AM + U-74389G – 6.82 mcg/ml, AM + PR – 7.2 mcg/ml (фиг. 32).

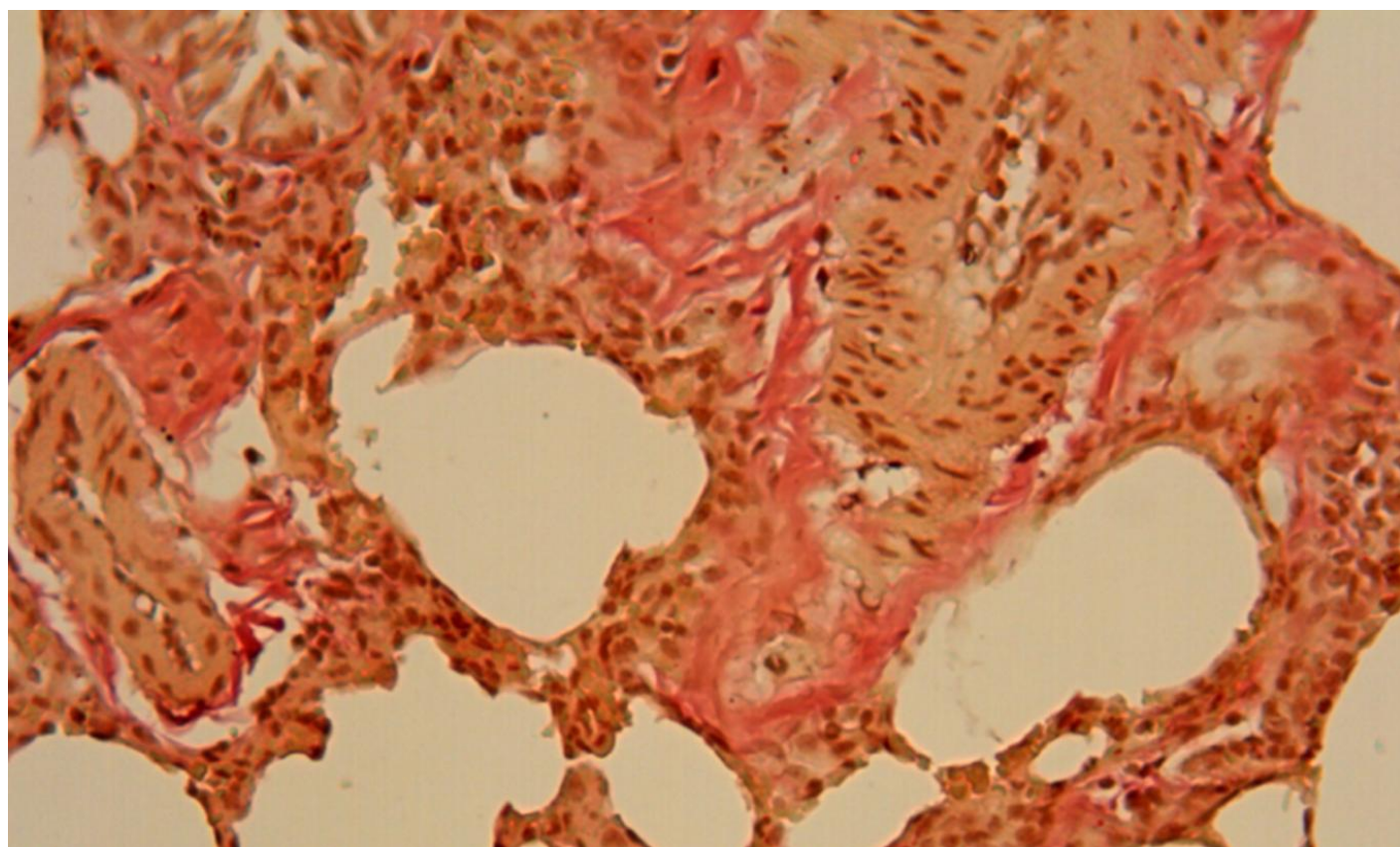
Интратрахеалната апликация на AM увеличи значително съдържанието на **колаген** в белодробния хомогенат на 28 ден (40.67 mcg/ml), докато комбинираното приложение на AM с U-74389G и AM с преднизолон дори намалиха количеството на колаген (съответно AM + U-74389G – 26.93 mcg/ml и AM + PR – 27.3 mcg/ml). В контролната група съдържание на колаген в белодробния хомогенат беше 30.07 mcg/ml (фиг. 32). Резултатите показват, че амиодаронът води до умерена интерстициална и перивазална фиброза, удебеляване на интерстициалните пространства и клетъчна инфилтрация, особено изразени на 28-ия ден. Изолираното интратрахеално приложение на амиодарон е свързано и със значително повишаване съдържанието на хидроксипролин и колаген в белодробния хомогенат на 28-ия ден, израз на белодробната фиброза. U-74389G и преднизолон сигнификантно и съпоставимо намаляват стойностите на тези маркери, доказвайки инхибиторният им ефект върху развитието на белодробната фиброза след интратрахеално приложение на амиодарон. Видимо е и че протективният ефект на U-74389G по отношение на белодробната фиброза на 28 ден леко превъзхожда този на преднизолон.



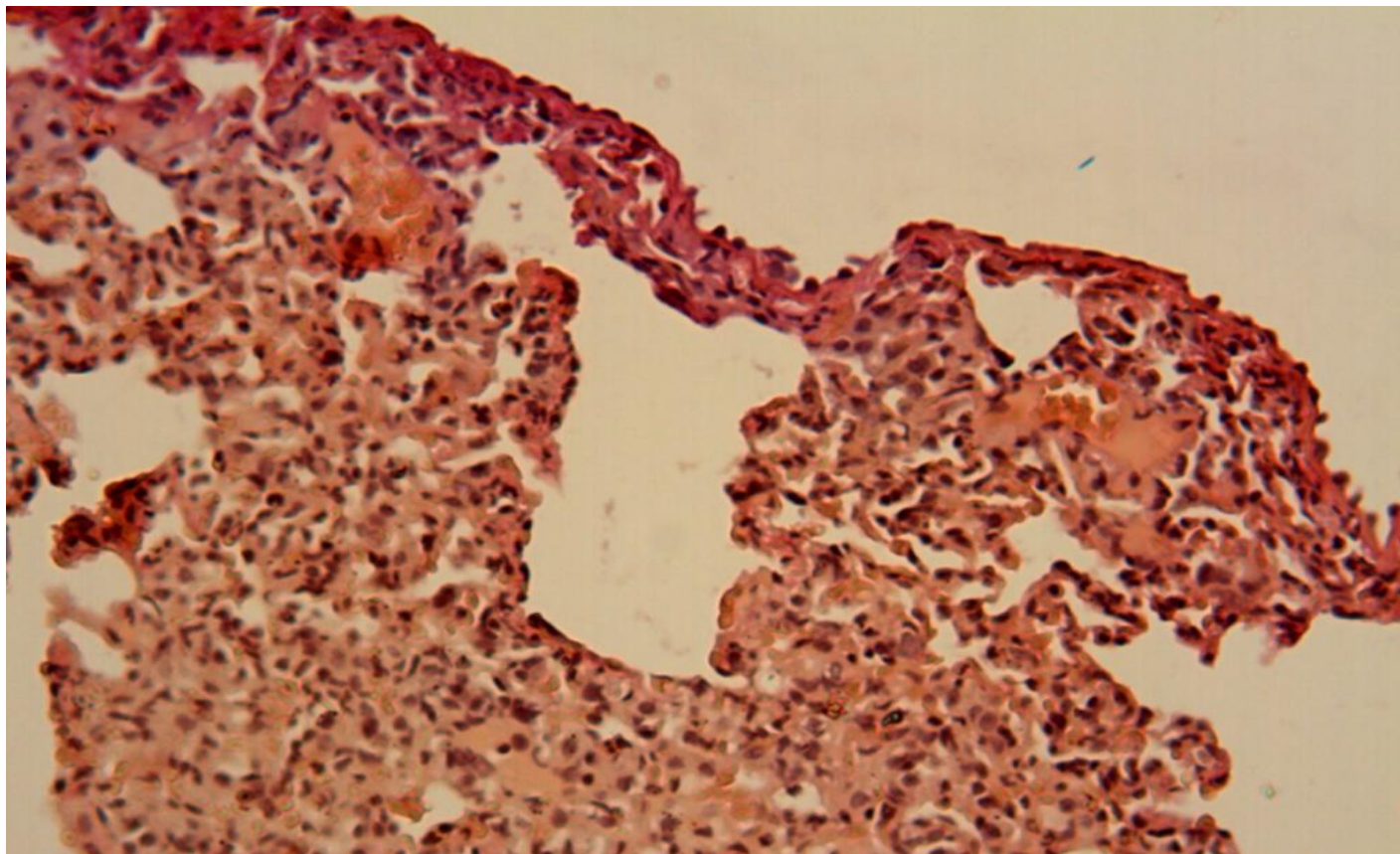
Фиг. 32. Ефект на U-74389G и преднизолон върху количеството на **хидроксипролин** и **колаген** в белодробен хомогенат на 28 ден след i.t. приложение на AM

* p<0.05 спрямо контрола; Δ p<0.05 спрямо AM

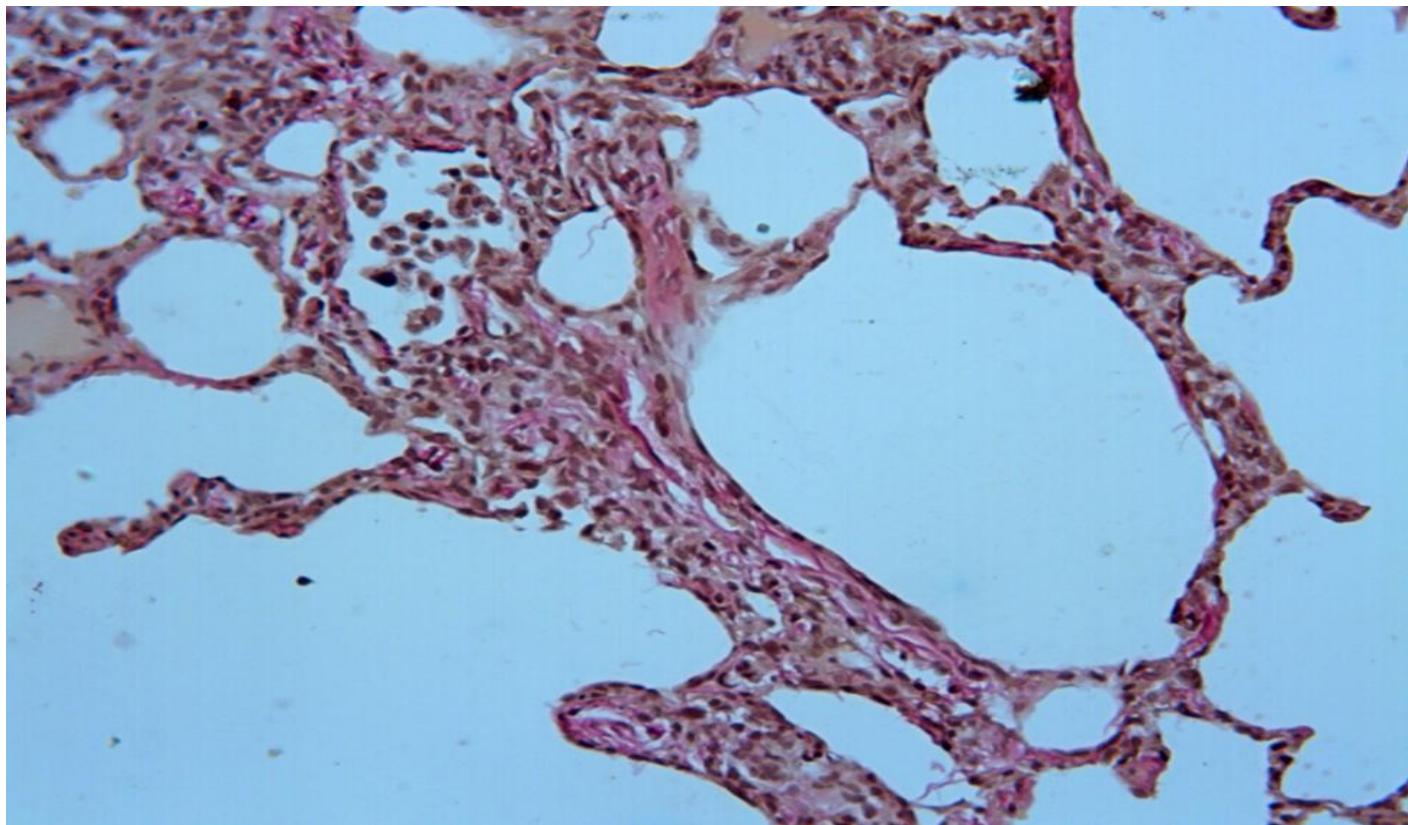
Хистология. Хистологичен образ на амиодарон индуцираната белодробна фиброза на 28 ден след приложението на амиодарон и възстановителните промени в групата лекувана с U-74389G (Фиг. 33-36).



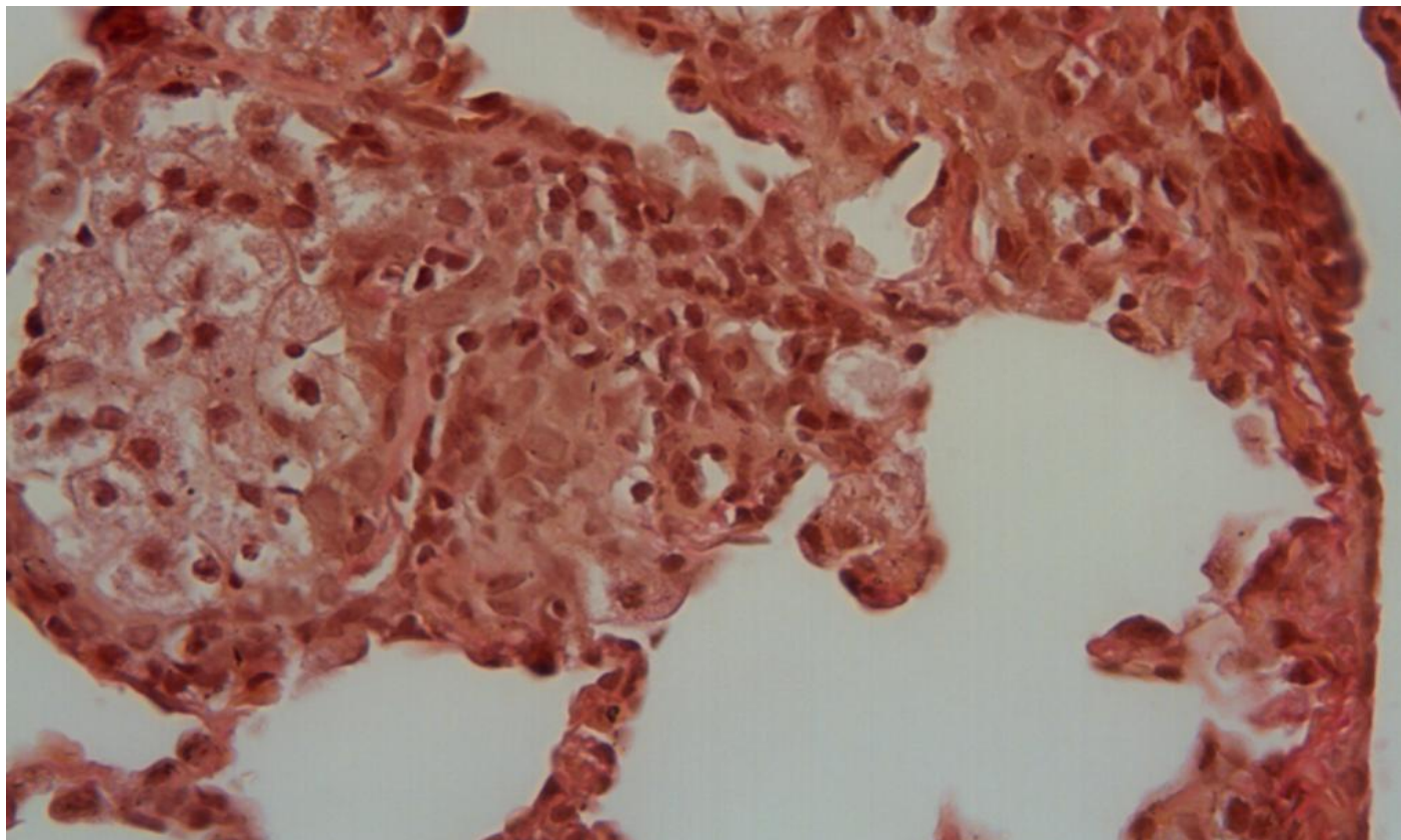
Фиг. 33. Хистологични промени на 28 ден след интратрахеална апликация на амиодарон: умерена интерстициална и перивазална фиброза, задебеляване на интерстициалните пространства (оцветяване Van Gieson, x100)



Фиг. 34. Хистологични промени на 28 ден след интратрахеална апликация на амиодарон: умесена субплеврална фиброза, клетъчна инфилтрация (оцветяване Van Gieson, x100)



Фиг. 35. Хистологични промени на 28 ден след интратрахеална апликация на амиодарон: умерена интерстициална и перивазална фиброза, задебеляване на интерстициалните пространства (оцветяване Van Gieson, x 100)



Фиг. 36. Хистологични промени на 28 ден след приложение на амиодарон и U-74389G: умерена интерстициална фиброза, фокално профелирали алвеоларни макрофаги (оцветяване Van Gieson, x 400).

Дискусия. Белодробната фиброза е хронично прогресиращо състояние със сериозна прогноза. Лечението му е симптоматично и слабо ефективно [Crouch E, 1990; 1995; Freis KM et al., 1994]. Белодробната фиброза е потенциална нежелана лекарствена реакция при повече от 25 лекарства – цитостатици, антиепилептични, противогъбичкови, антибактериални и др. Амиодаронът е бензофураново производно и е едно от най-широко използваните антиаритмични лекарства за лечения на надкамерни и камерни аритмии [Connolly, SJ 1999]. Въпреки, че терапевтичната му ефективност е неуспорима, приложението му се ограничава, поради профила на безопасност – токсични ефекти върху белите дробове, щитовидна жлеза, око, черен дроб, панкреас [Connolly, SJ 1999]. При около 6 - 8 % от лекуваните с АД болни се развиват тежки белодробни увреждания, с морталитет при 5-10% от засегнатите болни [Pitcher WD et al, 1992]. Промените при амиодарон индуцираната белодробна токсичност (АИБТ) са добре описани, докато патогенетичните механизми са ненапълно изяснени [Wilson BD et al., 1990; Reasor MJ et al., 1996], въпреки множеството *in vivo* и *in vitro* експерименти. АИБТ се изразява в: директен увреждащ ефект [Wilson BD et al., 1990], индукция на апоптоза или некроза на алвеоларните епителни клетки тип II [Bargout R et al., 2000], ендотелните клетки [Futamura Y, 1996; Kachel DL et al., 1990] и алвеоларните макрофаги [Reinhart et al., 1996], които генерират продукти като свободни радикали и фибронектин [Vereckei et al., 1993]; белодробна фосфолипидоза [Reasor MJ et al., 1996]; повлияване на свойствата на клетъчните мембрани и увеличаване на вътреклетъчния свободен калций [Powis, G. Et al., 1990]; митохондриална дисфункция [Card JW et al., 2003]; увреждане на епитела и базалните мембрани, последвано от миграция на инфламаторни клетки като макрофаги, лимфоцити и неутрофили в белодробния паренхим, освобождаване на цитокини (TGF- β 1, TNF- α , Il-1, Il-6), активиране на фибробластите, моделиране на извънклетъчния матрикс, вкл. отлагане на колаген [Card JW et al., 2003; 1995; Reinhart PG et al., 1997].

Разработени са множество модели на АИБТ при хамстери [Cantor et al., 1984; Daniels et al., 1989; Wang et al., 1992; Blake et al., 1995] и плъхове [Reinhart et al., 1997] с цел изясняване на патофизиологичните механизми на развитието ѝ. Оралното приложение на АМ при животни води до белодробна фосфолипидоза, без да предизвиква изразен възпалителен и фибротичен отговор [Heath et al., 1985; Riva et al., 1987]. При прилагане на много високи дози АМ продължително (13 месеца) са описани инфламаторни промени и белодробна фиброза [Vereckei, 1993; Carvalho et al., 1996]. Интратрахеалното приложение на АМ води до развитие на възпалителна реакция [Cantor et al., 1984; Blake and Reasor, 1995] и последваща фиброза при хамстери и плъхове [Reinhart et al., 1997; Taylor et al., 2000; 2003]. Според Taylor еднократното приложение на АМ интратрахеално, в доза 6,25 mg/kg като воден разтвор с концентрация 3,125 mg/ml на плъхове не води до повишаване на нивото на хидроксипролина, използван като маркер за белодробна фиброза. Въвеждането му на 0 и 2 ден води до по-изразена фиброза, максимално изразена на 28 ден [Taylor et al., 2002].

Експерименталните данни показват, че интратрахеалното вливане на 6,25 mg/kg амиодарон на ден 0 и 2 причинява токсично белодробно увреждане. Резултатите от проучването ни дават основание да предположим, че амиодаронът може да повлияе на антиоксидантната защитна система в белите дробове. Изследванията върху **белодробния хомогенат** показват, че активността на ключовия антиоксидантен ензим **супероксид дисмутаза (SOD)**, намалява значително на 3-тия ден след лечение с амиодарон (група 2). В същия момент активността на SOD след комбинирано лечение с амиодарон и U-74369G (група 3) намалява по-малко, отколкото в групата с АМ.

Промените в активността на **каталаза (CAT)** показват различна кинетика. Нивата на CAT в групи 2 и 3 се увеличават значително на 3-тия ден в сравнение с контролите. Този индекс в група 3 остава под ензимната активност измерена в групата с амиодарон, но не е установена значителна разлика между двете третирани групи (2 и 3).

Активността на друг ключов антиоксидантен ензим, **глутатион пероксидаза (GPX)**, намалява значително и в двете групи 2 и 3, на 3-тия и 7-мия ден, в сравнение с контролната група. Динамиката в ензимните активности доказва, че U-74389G смекчава токсичните ефекти на амиодарон по отношение на активността на ключовите антиоксидантни ензими.

На 7-мия ден в групата, лекувана с амиодарон, е установено повишаване на плазмените концентрации на **хидропероксид** и съдържанието на **малондиалдехид (MDA)**, което показва възможно увеличение на липидната пероксидация и индуцираното от оксиданти увреждане в белите дробове в този момент. Литературата показва противоречиви данни за влиянието на амиодарон върху липидната пероксидация. Някои автори приемат, че оксидативният стрес играе ключова роля в индуцираната от АМ пневмотоксичност [Jessurum GA et al., 1997; Leeder RG et al., 1994] и че причинява дестабилизация на мембраната [Leeder RG et al., 1994]. Изследвайки защитното действие на L-карнитина при индуцираните от амиодарон белодробни промени, Гадо и Алдамаш установяват, че АМ повишава нивата на глутатион редуктаза и намалява нивата на SOD, каталаза и съдържание на MDA в белодробния хомогенат [Gado AM et al., 2013]. Амиодаронът повишава ензимната активност на SOD, каталазата, както и липидната пероксидация в други органи на плъхове (черен дроб, бъбреци, тестиси) след перорално приложение [Chakraborty A et al., 2014]. Интратрахеалното вливане на амиодарон при хамстери индуцира повишаване на липидната пероксидация в бронхоалвеоларната лаважна течност и белодробния хомогенат [Blake TL et al., 1995]. Ribeiro et al. демонстрират, че амиодаронът не повлиява антиоксидантната ензимна активност и инхибира около 70% от липидната пероксидация [Ribeiro SM et al., 1997]. Обратно, други изследователи откриват производство на свободни радикали в разтвори на АМ и образуване на арилни радикали при фотолиза на водни разтвори на амиодарон или N-дезетиламиодарон [Nicolescu AC et al., 2007]. Предполага се също, че генерирането на хидроксилни радикали в концентриран воден разтвор на АМ е свързано с наличието на С-центриран радикал в молекулата на амиодарона. Nicolescu et al. предполагат, че митохондриалната дисфункция в периферните белодробни епителни клетки в ранна фаза е по-значима причина за АМ токсичност, отколкото свръхпроизводството на ROS [Nicolescu AC et al., 2007].

Доказано е, че алвеоларните макрофаги са първият клетъчен тип, засегнат в белия дроб, което води до "пенлива" проява, процес, обвързан с инициирането на фосфолипидоза [Reasor MJ et al., 1996; Bargout R et al., 2000]. Беше установено, че **"пенливи" алвеоларни макрофаги** са склонни да променят белодробното възстановяване и/или прогресията на фиброзата след прилагане на АМ. В нашето проучване се откри значително увеличение на броя на макрофагите в групата, третирана с амиодарон. Цитоплазмата в тези макрофаги беше пенлива и вакуолизирана (Фигури 8 и 9). Резултати в съответствие с Nacca et al. [Nacca N et al., 2012], които споменаха, че класическата находка са натоварените с липиди макрофаги в алвеоларните пространства, известни като "пенливи" клетки, при белодробна токсичност, индуцирана от амиодарон. Това лекарство също така насърчава натрупването на фосфолипиди в тъканите и има силен инхибиторен ефект върху лизозомната фосфолипаза, водещ до натрупване на фосфолипиди в богати на мембрани структури [Jessurum GA et al., 1997; Bargout R et al., 2000]. Амиодаронът повлиява производството на токсични кислородни радикали и може да индуцира натрупването на фосфолипиди в тъканите с директен цитотоксичен ефект върху алвеоларно-капилярната мембрана в белия дроб.

Въпреки че възпалението не е забележим процес, възпалителният отговор е важна характеристика на белодробната токсичност, предизвикана от амиодарон. Възпалението включва набирането на специфични клетки, включително полиморфонуклеарни неутрофили, лимфоцити, плазматични клетки и еозинофили [Halliwell WHY, 1997]. Възпалителните клетки могат да индуцират увреждане на тъканите чрез освобождаване на токсични вещества като кислородни свободни радикали, протеази и възпалителни медиатори като цитокини и хемокини. Демонстрира се ранен възпалителен отговор след приложение на амиодарон в белите дробове с четирикратно увеличение на общия брой клетки и съдържанието на протеини в БАЛТ на 3-ия ден след лечението с АМ, както и значително увеличение на броя на неутрофилите, който остава повишен до 28-ия ден [Stavreva GT, Shopova VL, Dancheva VY, 2008].

Белодробната фиброза, предизвикана от амиодарон, е сериозно усложнение, но механизмът ѝ остава не напълно изяснен. Чрез електронно-микроскопски и хистологични изследвания, Махди демонстрира изразена белодробна фиброза след хронично перорално лечение с АМ при плъхове [Mahdy AA et al., 2014]. Повтарящите се промени, свързани с възпалителния процес, се считат за катализатори на прогресията на фиброзния отговор. Повишаването на съдържанието на хидроксипролин на 14-ия и 28-ия ден след лечение с амиодарон подкрепя твърдението, че АМ може да доведе до белодробна фиброза.

21-аминостероидът U-74389G отслабва ефектите на амиодарон върху липидната пероксидация. Лазароидите инхибират мембранната липидна пероксидация чрез улавяне на пероксилни радикали, механизъм, подобен на този на витамин Е. Те потенцират антиоксидантната ефикасност на витамин Е, като забавят окислението на витамин Е по време на пероксидацията на линолова киселина [Braugher JM et al., 1987]. Лазароидите инхибират оксидантно-медирано увреждане в изолирани бели дробове на плъхове след исхемия/реперфузия [Haynes J et al., 1970]. Те също така имат висок афинитет към мембранните липиди и чрез включване в липидния бислой поради тяхната липофилност, лазароидите произвеждат стабилизиращи клетъчната мембрана ефекти. Протонираният пиперазинов азот взаимодейства с отрицателно заредени фосфат-съдържащи главни групи на мембранный липиден бислой. Това действие ограничава движението на липидни пероксилни радикали в мембраната, като по този начин намалява взаимодействието им с мастни киселини и инхибира липидната пероксидация. Изследванията на Saija et al. доказват силната антиоксидантна активност на U-74389G в мембранна система [Saija A et al., 2001]. Те предположиха, че U-74389G може да действа като уловител на верижно разпространяващи се липидни пероксилни радикали в мембраните. Лазароидът предпазва не само клетъчните мембрани от пероксидативен стрес, но и вътреклетъчните компоненти.

Резултатите, получени от нашето проучване, показват, че развитието на белодробна фиброза е значително инхибирано от U-74389G на 14-ия и 28-ия ден след инстилиране на амиодарон, въз основа на намаленото съдържание на хидроксипролин и находката при морфологичното изследване.

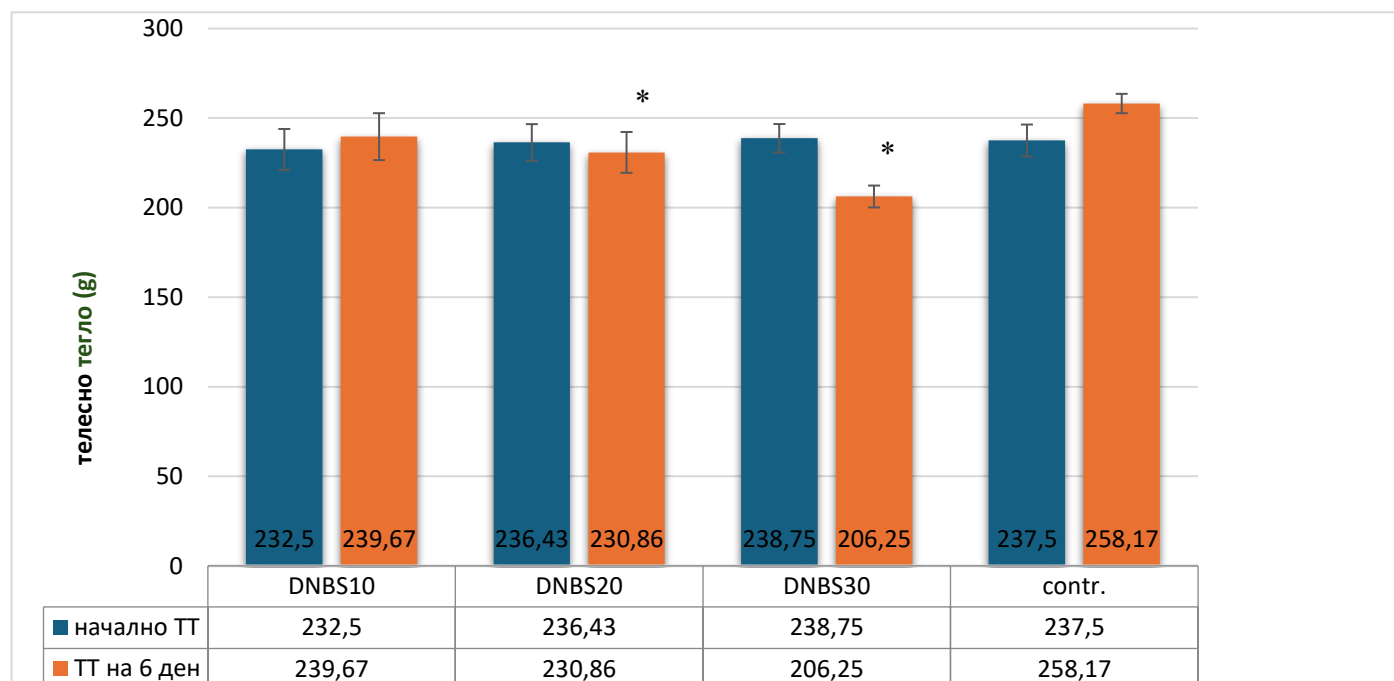
В заключение, интратрахеалното приложение на амиодарон води до тежки токсични увреждания на белодробния паренхим при плъхове, оценени чрез биохимични маркери в белодробния хомогенат и плазмата. Амиодаронът повлиява антиоксидантната защитна система в белите дробове, насърчава липидната пероксидация и причинява интерстициална и перивазална белодробна фиброза, свързана и със значително повишаване съдържанието на хидроксипролин и колаген в белодробния хомогенат на 28-ия ден. 21-аминостероидът U-74389G значително инхибира липидната пероксидация и смекчава фиброзните промени в белите дробове на плъхове, провокирани от амиодарон

2. Ефект на U-74389G при експериментален модел на колит

2.1.Избор на подходящ експериментален модел на ВЗЧ (възпалителни заболявания на червата).

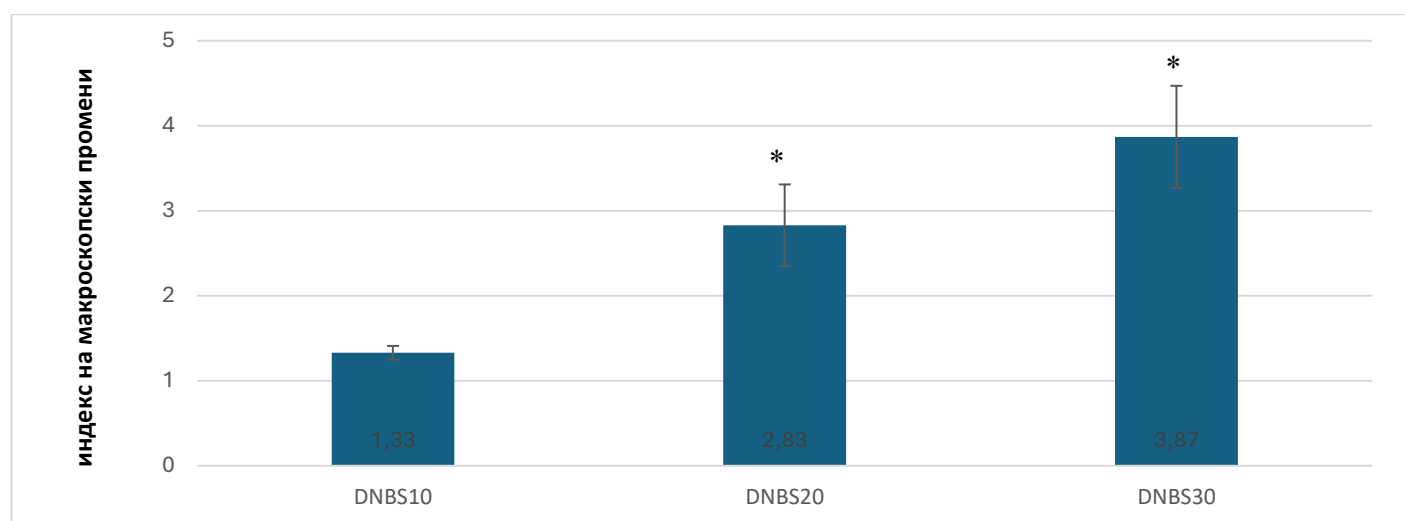
Целта на проведеното изследване е да се установи възпроизводим и подходящ експериментален модел на химически колит за изследване на ефекта на лекарствени субстанции. Експериментите са проведени върху 32 мъжки бели плъха порода Wistar, разделени в 4 групи: контрола, третирани с 0.25 мл 50% алкохол, ректално, въведен със сонда на 8 см в колона и три експериментални групи, третирани с улцерогенния агент динитробензенсулфонова киселина (2,4-Dinitrobenzenesulfonic acid hydrate, DNBS): DNBS 10 – с експериментален колит, предизвикан от 10 mg DNBS разтворен в 0.25 мл 50% алкохол, въведен ректално, със сонда на 8 см в колона; DNBS 20 и DNBS 30, с доза на DNBS съответно 20 и 30 mg. Проследявани са телесното тегло, приема на храна и консистенцията на фекалните маси като клинични маркери на предизвикания колит. На 6 ден дебелото черво е отстранено и е извършена оценка на тежестта на възпаление на червата макроскопски и хистологично, в съответствие с критериите, съобщени от Antonioli и сътрудници [Antonioli et al., 2007]. Критериите за макроскопско точкуване на увреждането на дебелото черво са следните: наличие на сраствания между колона и други органи (0 – няма, 1 – малки и 2 – големи сраствания); наличие на улцерация (0 – не, 1 – хиперемия, 2 – разязвяване без възпалителна реакция, 3 – разраняване с възпаление на 1 участък, 4 – 2 участъка с язви и възпаление, 5 – големи увреждания с площ < 2 cm, 6 – големи увреждания с площ > 2 cm); резултатът се увеличава с 1 единица за всеки милиметър дебелина на стената на колона. Извършено е микроскопско изследване чрез светлинна микроскопия на участъци, оцветени с хематоксилин и еозин, и Ван Гизон, взети от област на възпален дистален колон; и имунологични изследвания на нивото на IL-1, IL-6, IL-10 и TNF-alpha в серума на експерименталните животни чрез ELISA.

Резултати и обсъждане. Плъхчетата, третирани с DNBS в дози 20 и 30 mg, разтворен в 0.25 мл 50% алкохол, въведен ректално, със сонда на 8 см в колона, значително редуцираха **телесното си тегло** и приема на храна в сравнение с контролните животни (Фиг. 37). Най-значително понижение на теглото спрямо началото на експеримента и контролата беше регистрирано в група DNBS 30 от 238.75 ± 7.9 g в началото на експеримента до 206.25 ± 6.09 g на 6-тия ден ($p=0.04$).



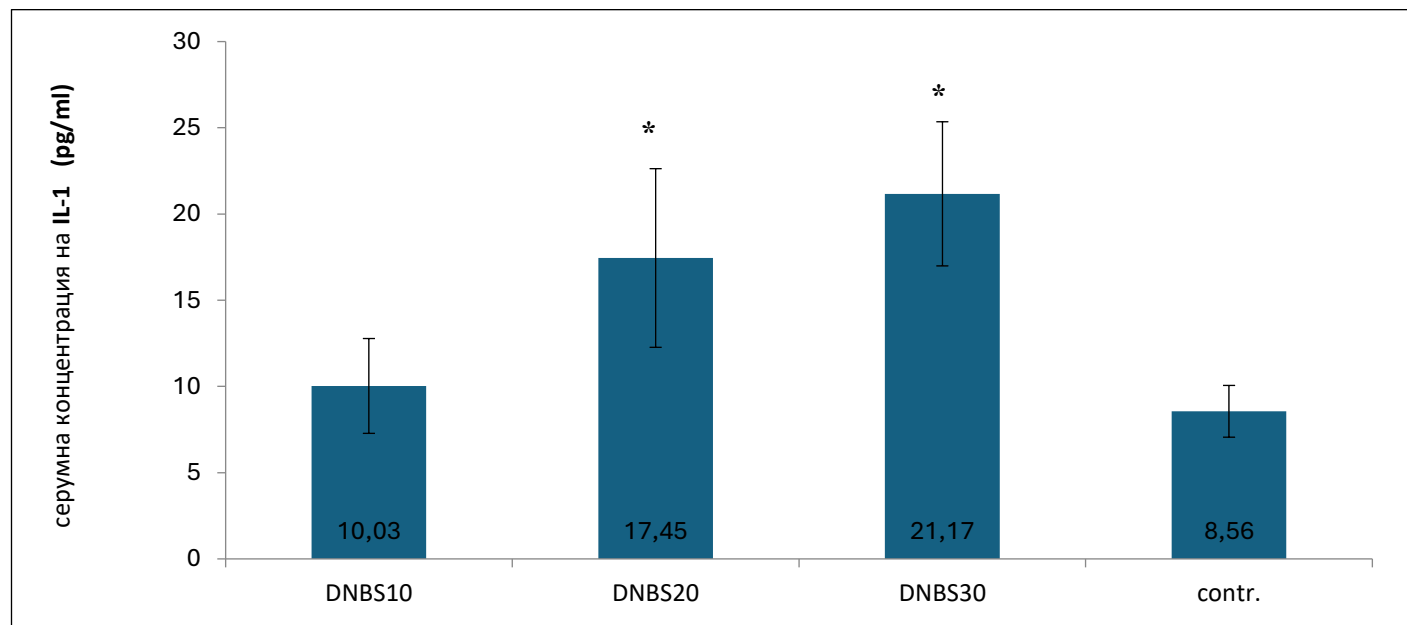
Фиг. 37. **Телесно тегло (ТТ)** на животните в началото на експеримента и на 6-ти ден след интаректално прилагане на DNBS в доза 10, 20 и 30 mg. * $p < 0.05$ спрямо контролната група.

Индексът, отразяващ макроскопските промени при приложение на улцерогения агент DNBS в доза 10 mg беше 1.33 ± 0.08 (като 37.5% от животните бяха без язвени дефекти); в доза 20 mg – 2.83 ± 0.48 (също 3 от 8 плъхчета – 37.5% бяха без язвени дефекти); в доза 30 mg – 3.87 ± 0.6 (Фиг. 38). Хистологичните изследвания показаха задебелена стена на дебелото черво с множествени мозаечно пръснати полета на фибриноидна некроза (язви) в мукозата достигащи до lamina propria. В съседство лигавицата беше с променена архитектура – деформирани крипти, намаляване на чашковидните летки и единични крип абцеси; изразен възпалителен инфилтрат в lamina propria, m. mucosae; и задебеляване на lamina propria. Имунологичните изследвания показаха статистически значимо по-високо ниво на проинфламаторните цитокини на **IL-1** (Фиг. 39), **IL-6** (Фиг. 40) и **TNF-алфа** (Фиг. 41) в серума на плъчетата, третирани с DNBS дози 20 и 30 mg, докато нивото на антиинфламаторния **IL-10** беше сигнификантно по-ниско във всички групи с индуциран колит в сравнение с тези в контролните животни (Фиг. 42).

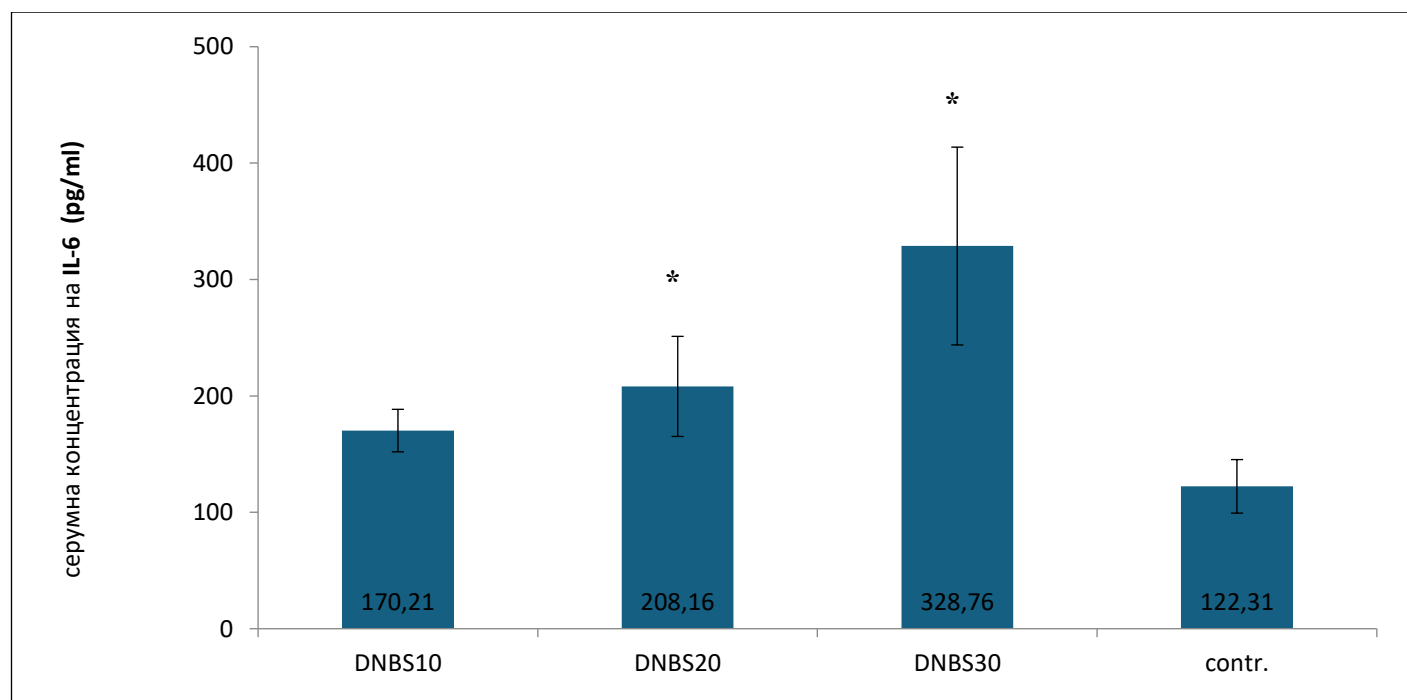


Фиг. 38. **Индекс, отразяващ макроскопските промени** в дистален колон на 6-ти ден след интаректално прилагане на DNBS в доза 10, 20 и 30 mg. * $p < 0.05$ спрямо контролната група.

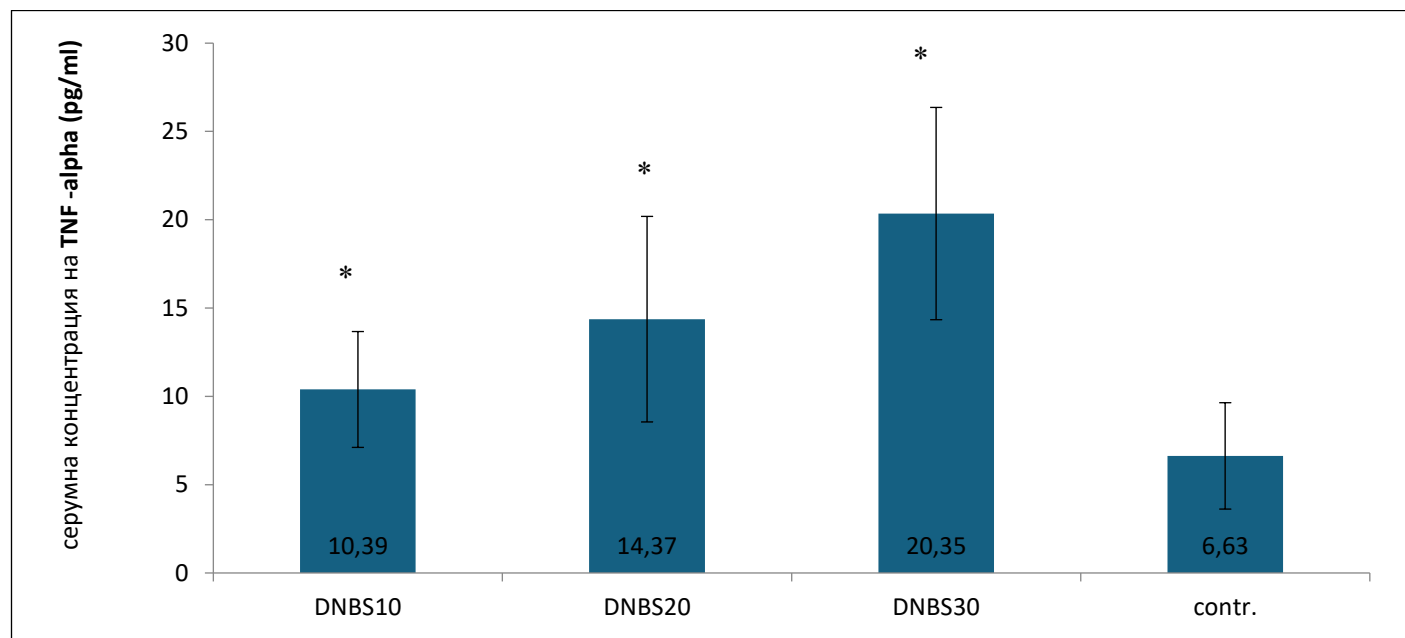
Изследваният експериментален модел води до възпаление на лигавицата на стомашно-чревния тракт, образуване на язви, оток, кървене, загуба на тегло, характерни за възпалителните промени в серумните цитокини и клинични прояви [Cohen et al. 2004; Thoreson a. Cullen, 2007; Wells a. Blennerhassett, 2004]. Хаптен-индуцираният 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid hydrate (DNBS) колит е прост и ефективен модел за остро и хронично възпаление и/или улцерации на колона. Улцерогенният агент DNBS, приложен интаректално в дози 10 и 20 mg води до язвени промени в 62.5% от животните, поради което експерименталният колит, предизвикан от тези дози на агресивната субстанция се прецени като неподходящ за изследване на ефекта на вещества с очакван протективен ефект.



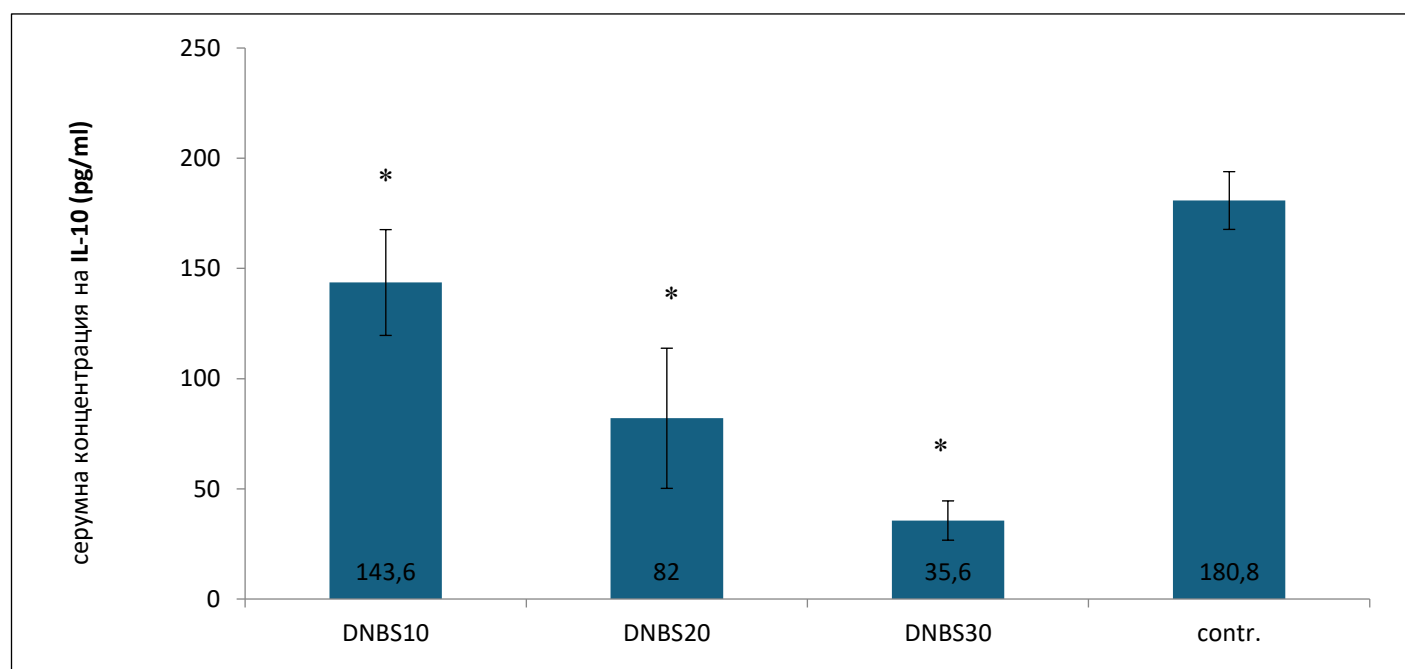
Фиг. 39. Серумни концентрации на **IL-1** на 6-ти ден след интаректално прилагане на DNBS в доза 10, 20 и 30 mg. * $p < 0.05$ спрямо контролната група.



Фиг. 40. Серумни концентрации на **IL-6** на 6-ти ден след интаректално прилагане на DNBS в доза 10, 20 и 30 mg. * $p < 0.05$ спрямо контролната група.



Фиг. 41. Серумни концентрации на **TNF-alpha** на 6-ти ден след интраректално прилагане на DNBS в доза 10, 20 и 30 mg. * $p < 0.05$ спрямо контролната група.



Фиг. 42. Серумни концентрации на **IL-10** на 6-ти ден след интраректално прилагане на DNBS в доза 10, 20 и 30 mg. * $p < 0.05$ спрямо контролната група.

DNBS приложен в доза 30 mg интраректално води до развитие на експериментален колит с различна тежест във всички изследвани животни и тази доза се прецени като подходяща в експеримент за доказване на ефекта на субстанции с противовъзпалително и/или протективно действие.

Дозата на DNBS от 20 mg се прие за подходяща за предизвикване на възпалителни промени в експерименти, касаещи изследване на двигателната активност, защото при хистологичните изследвания язвените промени не пенетрираха до мускулния слой на стената на дебелото черво.

Заклучение. Резултатите от проведените експерименти показват, че DNBS в доза 30 mg индуцира възпроизводим колит във всички експериментални животни и е подходящ модел за изследване на ефекта на потенциални лекарства, като например U-74389G.

2.2.Изследване на ефекта на U-74389G върху експериментален модел на възпалителни заболявания на червата

Опитните животни са разделени на 4 групи от по 8 животни на случаен принцип: 1. **Контролна група** - плъхчетата се третират интаректално с физиологичен разтвор. 2. **DNBS група** - дозата от 30 mg DNBS, разтворена в 0.25 ml 50% етанол, се вкарва в дебелото черво еднократно с гумен катетър. 3. **U-74389G група** – лазароидът се инжектира интраперитонеално в доза 5 mg/kg за 6 дни, започвайки 1 ден преди предизвикването на колит. 4. **Сулфасалазин (SS) група** – плъхчетата с експериментален колит са третирани със сулфасалазин, перорално, в доза 300 mg/kg, веднъж дневно в продължение на 6 дни, започвайки 1 ден преди предизвикването на колит. На 6-ия ден животните се умъртвяват и се получават проби от сегмента на дебелото черво.

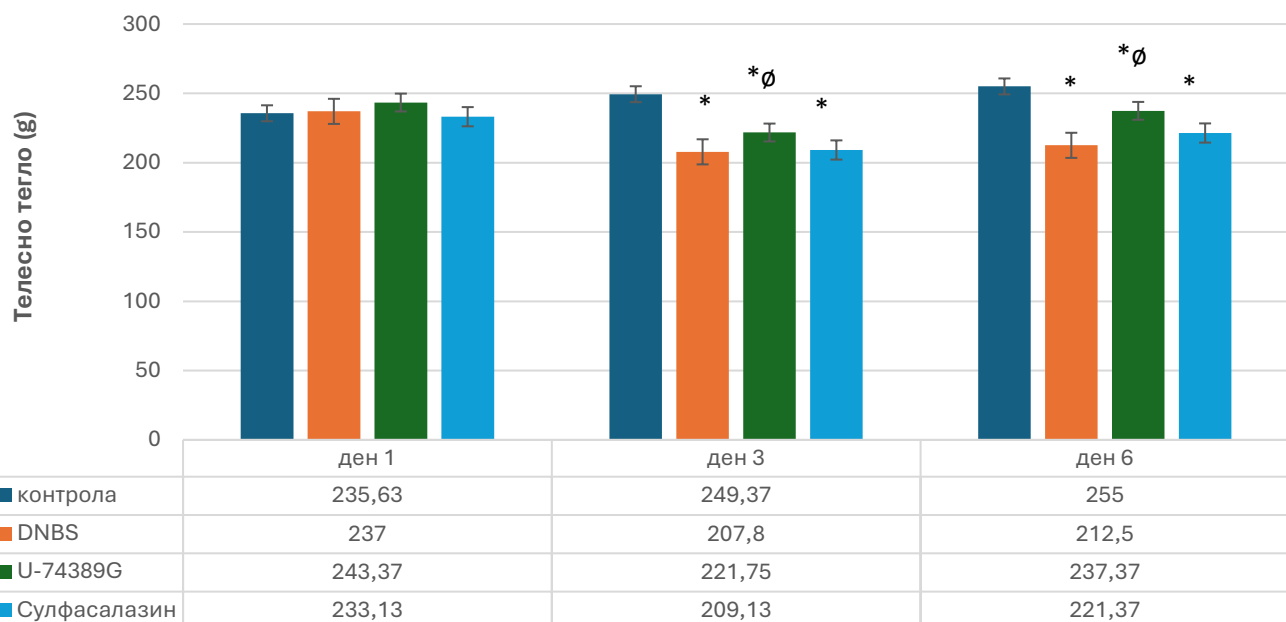
Резултати. Промените в телесното тегло (фиг. 43), приема на храна (фиг. 44) и състоянието на диарията се приемат като индикатори за активността на заболяването. През 5-те дни след индуцирането на колит, третирани с DNBS плъхове показват значително намаление на телесното тегло, най-изразено на ден 3 ($P<0.05$). Консумацията на храна е значително по-малка от тази на контролните плъхове, както и при групите третирани с U-74389G и сулфасалазин през първите 3 дни след поставянето на DNBS (Таб. 8).

Таблица 8. Промени в телесното тегло и приема на храна

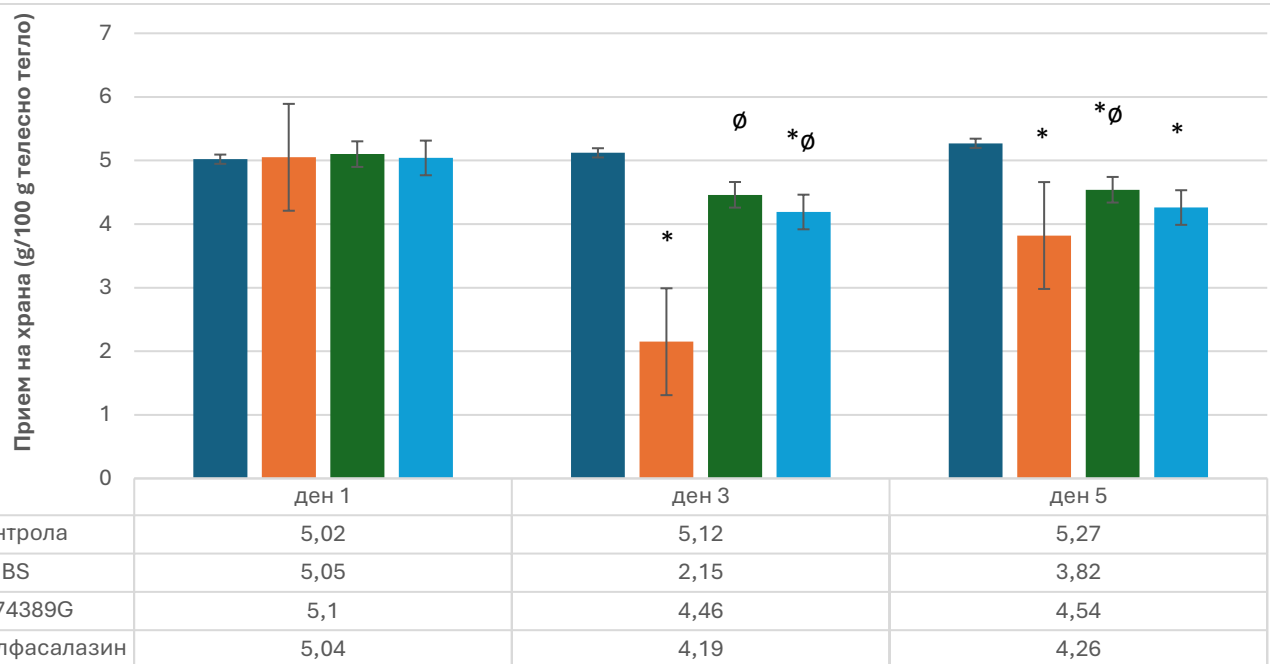
групи	Телесно тегло (g)			Прием на храна (g/100 g телесно тегло)		
	ден 1	ден 3	ден 6	ден 1	ден 3	ден 5
Контролна група	235.63±5.93	249.37±3.59	255.00±4.23	5.02±0.09	5.12±0.07	5.27±0.08
DNBS група	237.00±2.52	207.80±4.75*	212.50±6.25*	5.05±0.08	2.15±0.17*	3.82±0.19*
U-74389G група	243.37±4.62	221.75±3.65* $\emptyset$	237.37±5.25* $\emptyset$	5.1±0.09	4.46±0.04 $\emptyset$	4.54±0.22* $\emptyset$
Сулфасалазин група	233.13±4.90	209.13±3.97*	221.37±2.42*	5.04±0.07	4.19±0.07* $\emptyset$	4.26±0.12*

Всеки резултат е даден като средна стойност от осем плъха $\pm$ SEM.

(*) показва значителна разлика в сравнение с контролните животни; ($\emptyset$) показва значителна разлика в сравнение с третирани с DNBS животни.

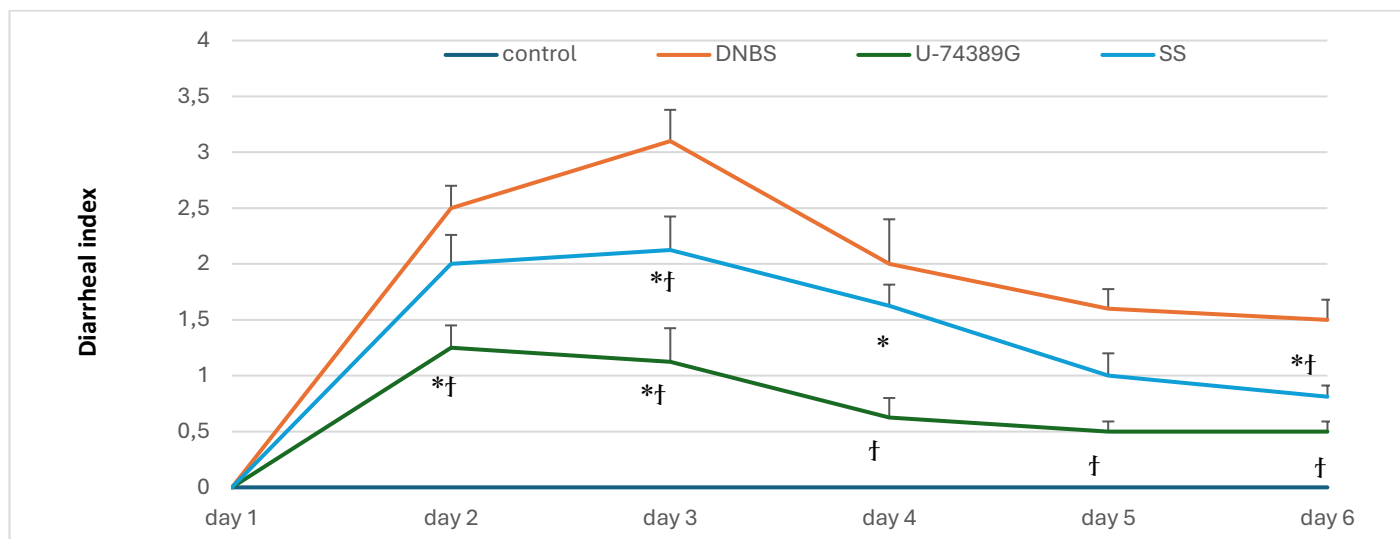


Фиг. 43. Промяна в **телесното тегло**. Всеки резултат е даден като средна стойност от осем плъха $\pm$ SEM. (*) показва значителна разлика в сравнение с контролните животни; ($\emptyset$) показва значителна разлика в сравнение с третирани с DNBS животни.



Фиг. 44. Промяна в **приема на храна**. Всеки резултат е даден като средна стойност от осем плъха $\pm$ SEM. (*) показва значителна разлика в сравнение с контролните животни; ($\emptyset$) показва значителна разлика в сравнение с третирани с DNBS животни.

Състоянието на диарията се оценява въз основа на консистенцията на изпражненията и наличието на кръв в тях (Фиг. 45). Промени в индекса на диарията са наблюдавани при всички животни с предизвикан колит. Най-високият **диаричен индекс (diarrheal index)** със стойност 3,1 беше оценен на ден 3 в DNBS групата. Не са наблюдавани значителни разлики в състоянието на диарията и приема на храна на ден 6 между контролната група и плъховете с колит, третирани с U-74389G в доза от 5 mg/kg.

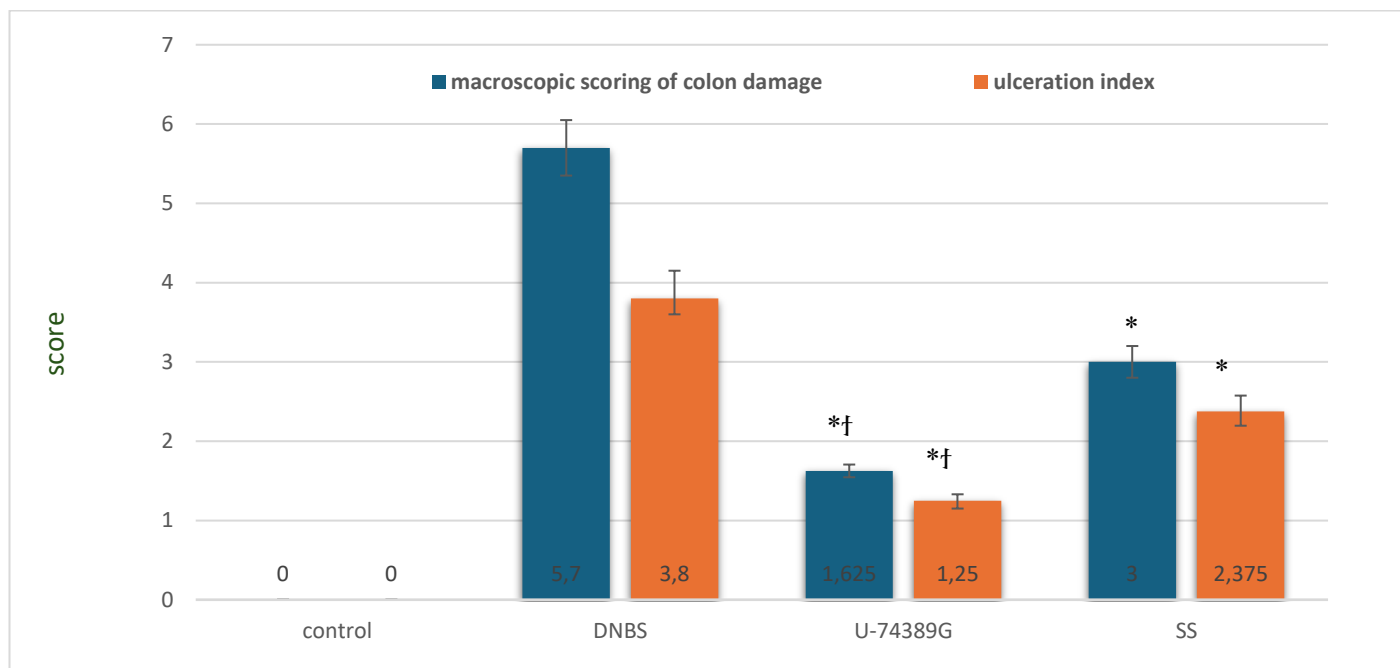


Фиг. 45. Ежедневно състояние на диария в продължение на 6 дни след предизвикване на колит. Всеки резултат е даден като средна стойност от осем плъха $\pm$ SEM. (*) показва значителна разлика в сравнение с контролните животни; (†) показва значителна разлика в сравнение с третирани с DNBS животни.

Макроскопско изследване. Третирването с DNBS предизвиква тежко възпаление и язва при плъхове с колит (Фиг. 46 и Фиг. 47), изразено чрез **язвен индекс (ulceration index)** $3,87 \pm 0,61$ и **макроскопско оценяване увреждането на дебелото черво (macroscopic scoring of colon damage)** - $5,7 \pm 0,74$ (наличие на сраствания, язви и удебеляване на стената на дебелото черво). Макроскопската оценка на тъкани, получени от животни, третирани с U-74389G, разкрива значителен благоприятен ефект ($P < 0,05$) на симптомите на ВЧЗ (индекс на улцерация $1,25 \pm 0,25$ и макроскопско оценяване на увреждане на дебелото черво $1,625 \pm 0,41$). Ефектът на сулфасалазин върху изследваните маркери е по-слабо изразен в сравнение с ефекта на U-74389G, както е видно на фигури 46 и 47.



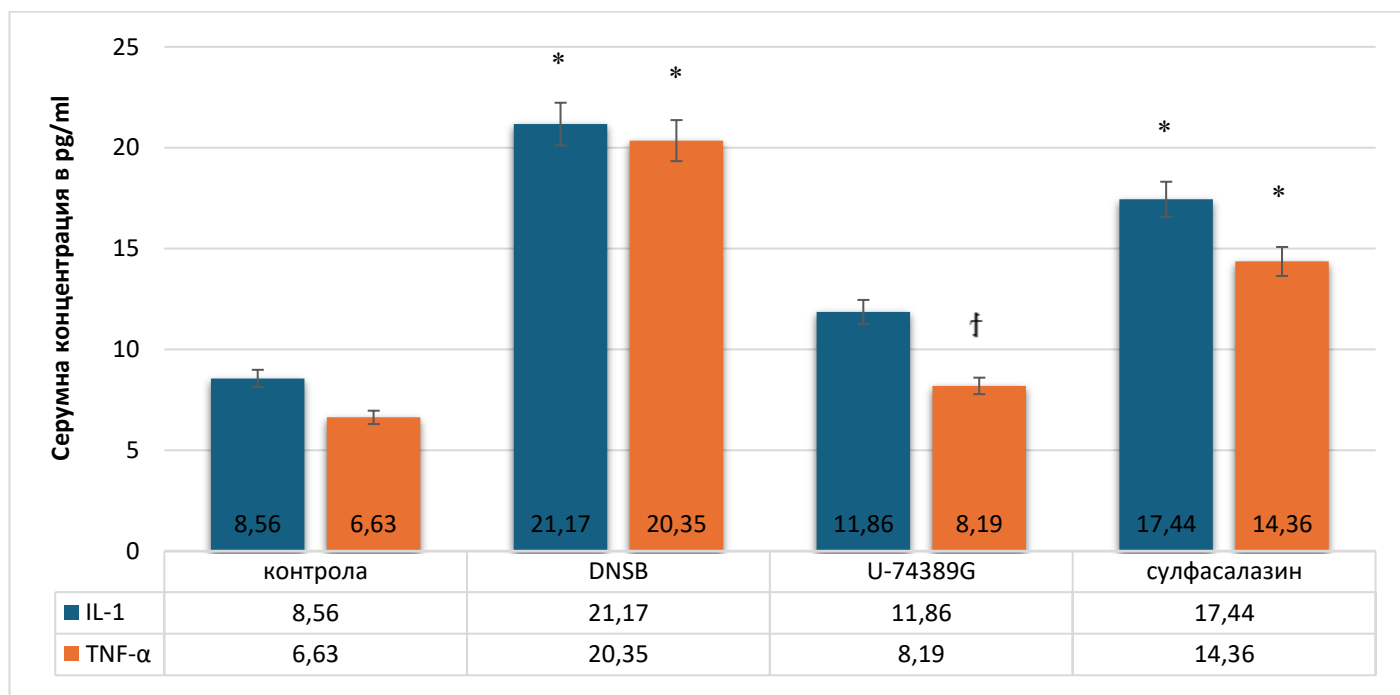
Фиг. 46. Макроскопски промени в дебелото черво на ден 6 след предизвикване на колит при животни, третирани с U-74389G, DNBS и SS.



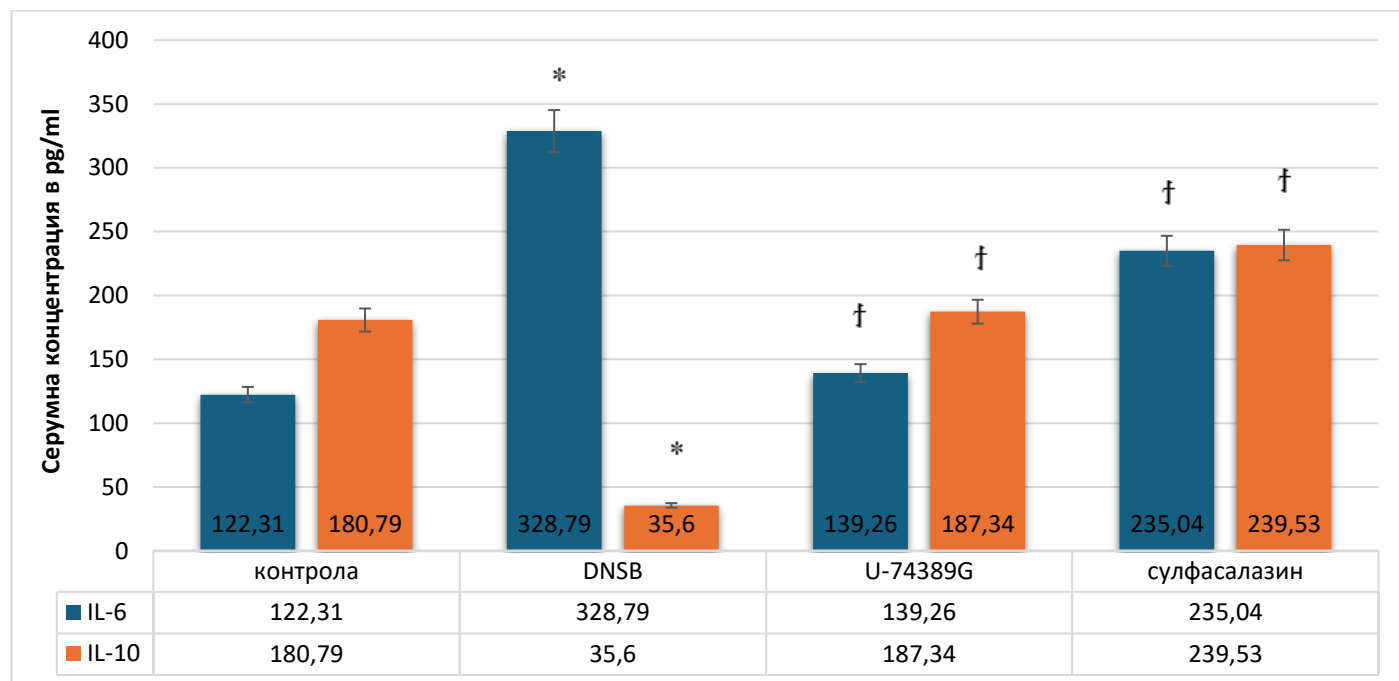
Фиг. 47. Резултат от макроскопско увреждане, оценен на ден 6 след предизвикване на колит с DNBS. Всяка колона представлява средна стойност $\pm$ SEM (n=). Контролните групи показват нулев резултат, тъй като не е развито заболяване. (*) показва значителна разлика в сравнение с животни, третирани с DNBS; (†) показва значителна разлика в сравнение с третирани със сулфасалазин (SS) животни.

Имунологични изследвания. Имунологична оценка на нивата на цитокини.

Серумните нива на възпалителни цитокини **IL-1**, **IL-6** и туморен некрозис фактор -алфа (**TNF- α**) в групата, лекувана с U-74389G, са значително по-ниски от тези на DNBS групата, докато нивото на противовъзпалителните **IL-10** беше значително повишен от U-74389G (Фиг. 48 и Фиг. 49).



Фиг. 48. Серумни концентрации на възпалителни цитокини **IL-1** и **TNF- α** на ден 6 след индуциране на колит с DNBS. Всеки резултат е даден като средна стойност от осем плъха $\pm$ SEM. (*) показва значителна разлика в сравнение с контролните животни; (†) показва значителна разлика в сравнение с третирани с DNBS животни.



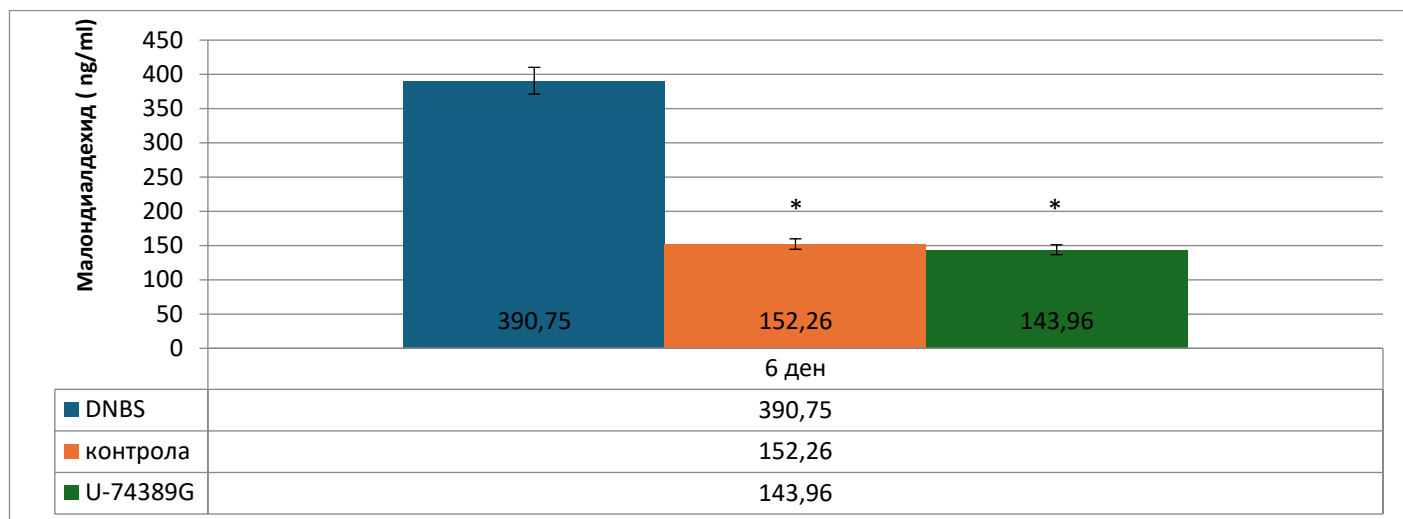
Фиг. 49. Серумни концентрации на възпалителен цитокин **IL-6** и противовъзпалителен цитокин **IL-10** на ден 6 след индуциране на колит с DNBS. Всеки резултат е даден като средна стойност от осем плъха $\pm$ SEM. (*) показва значителна разлика в сравнение с контролните животни; (†) показва значителна разлика в сравнение с третирани с DNBS животни.

Определяне на малонов диалдехид (MDA) в серум на плъхове с DNBS-индуциран колит като маркер за повишен оксидативен стрес при колит

Таблица 9. Средна стойност на **MDA**, стандартно отклонение, медиана и обхват за всяка група. Забележка: Стандартното отклонение при групата DNBS е значително по-голямо в сравнение с другите групи, което отразява вариабилност в тежестта на индуцирания колит.

Група	Средна (ng/ml)	SD	SE	Медиана	Мин - Макс	n
DNBS (колит)	390.75	212.99	86.95	380.81	105.85 - 685.39	6
Контрола	152.26	42.31	17.27	137.36	115.04 - 218.68	6
U-74389G (лечение)	143.96	65.16	26.60	123.14	94.99 - 273.17	6

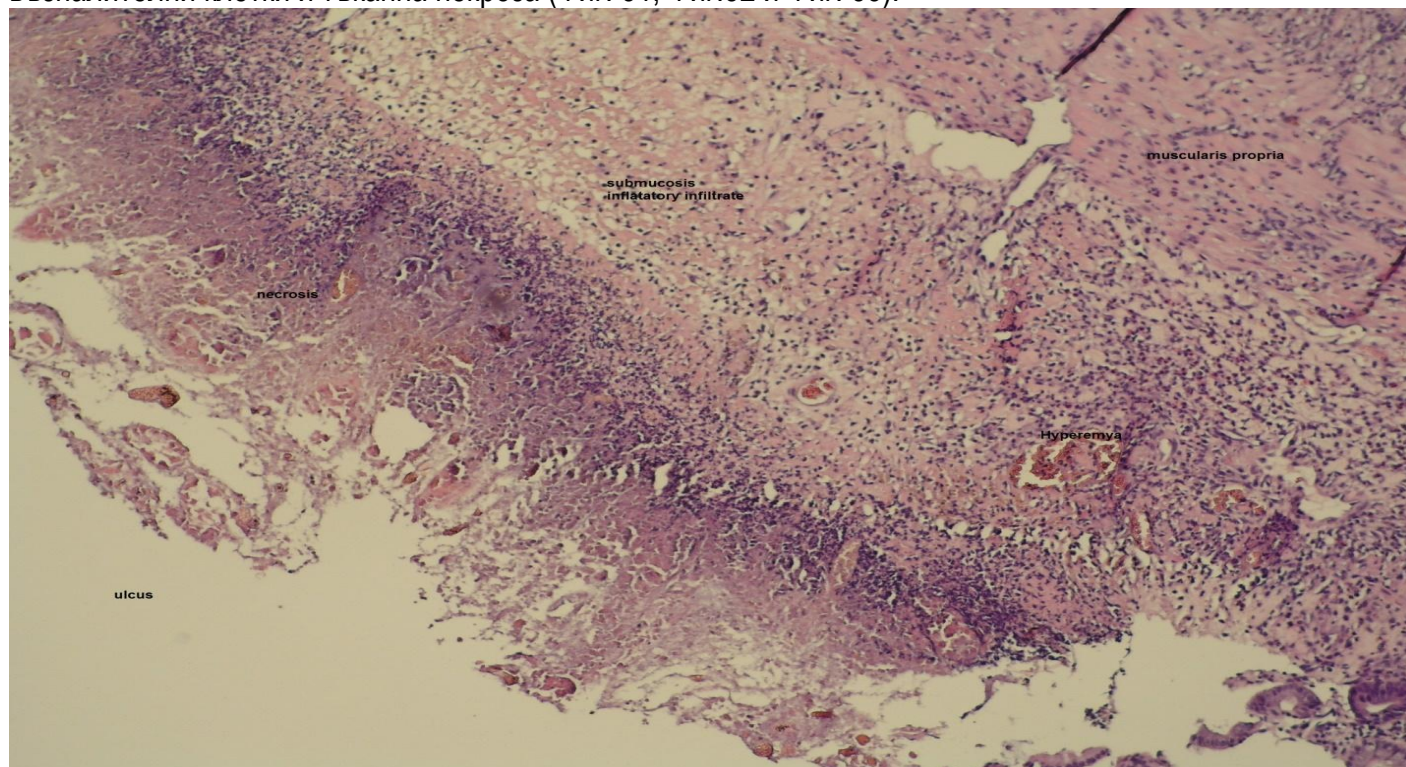
След третиране с DNBS, индуциращ остър колит при плъхове, на 6 ден бяха измерени нивата на малонов диалдехид (MDA) в серума, като маркер за повишен оксидативен стрес при колит. Групата с DNBS-индуциран колит показва значително по-висока средна стойност на MDA (390.75 ± 213.0 ng/ml) в сравнение с контролната група (152.26 ± 42.3 ng/ml). Тази разлика е статистически значима ($p < 0.05$), което потвърждава, че DNBS-индуцираният колит води до изразена липидна пероксидация и оксидативна увреда. Лекуваната с U-74389G група показва средна стойност на MDA (143.96 ± 65.2 ng/ml) — статистически значимо по-ниска от DNBS групата ($p < 0.05$) и неразличима от контролата ($p = 1.000$, ns). Това означава, че лечението с U-74389G нормализира нивата на **малоновия диалдехид** до базовите стойности (фиг. 50).



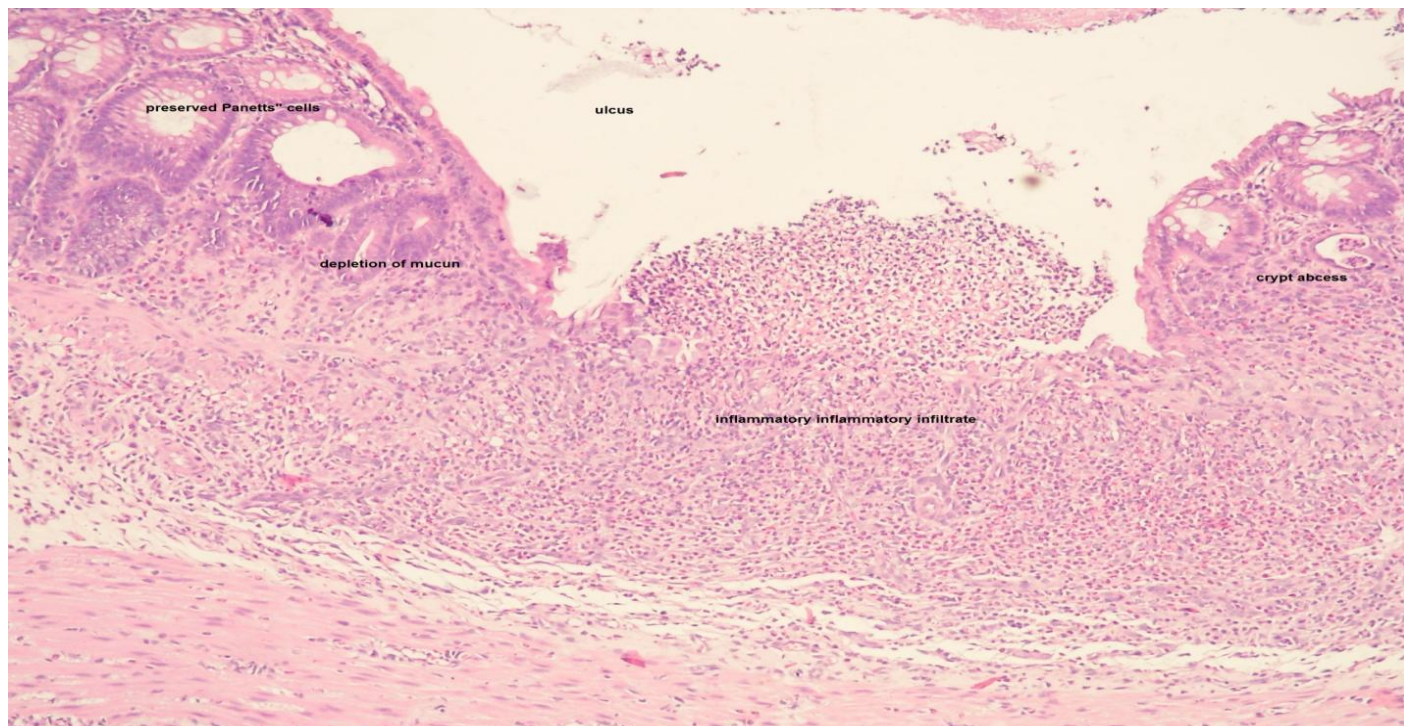
Фиг. 50. Концентрации на **малонов диалдехид (MDA)** на 6 ден в серум на плъхове с DNBS-индуциран колит; * $p < 0.05$ спрямо DNBS групата

Настоящите данни показват, че вещество U-74389G упражнява значим антиоксидантен протективен ефект в условията на DNBS-индуциран колит, редуцирайки липидната пероксидация до нива, неразличими от здравите контроли. Резултатите подкрепят потенциала му като противовъзпалителен и антиоксидантен агент при чревно възпаление.

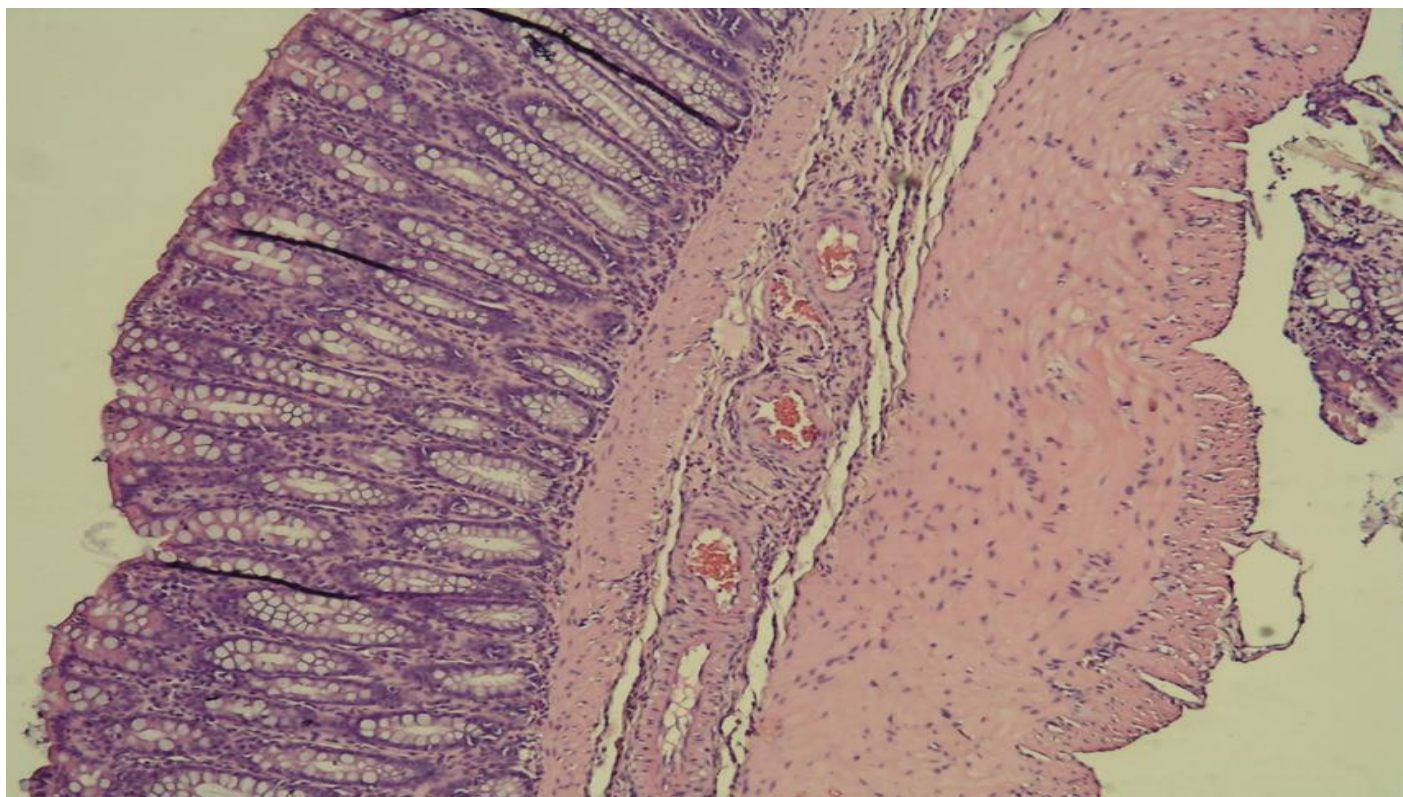
Хистология. При хистологичната оценка на дебелото черво от групата DNBS се наблюдава обширно увреждане, в някои области с язви, трансмурална инфилтрация с неутрофили и лимфоцити, изчерпване на слуз, кръвоизлив и оток. Групата DNBS имаше по-голяма степен на улцерация, следвана от групата SS, докато U-74389G показва значително намален кръвоизлив, инфилтрация на възпалителни клетки и тъканна некроза (Фиг. 51, Фиг.52 и Фиг. 53).



Фиг. 51. Хистологично изследване на плъхове, третирани с DNBS, показва големи области на мукозна некроза, където жлезистата архитектура е напълно разрушена; субмукозата е удебелена с оток и изразена инфилтрация с възпалителни клетки, свързани с вазодилатация; промени се наблюдават и в мускулния слой, който също изглежда удебелен (оцветяване хематоксилин-еозин, увеличение x100).



Фиг. 52. Хистологично изследване на плъхове, третирани с DNBS (оцветяване хематоксилин-еозин, увеличение x100). Стена от дебело черво с множествени мозаично пръснати полета на фибриноидна некроза - язви в мукозата, достигащи до мускуларис проприя. В съседство лигавицата е с променена архитектура - деформирани крипти, намаляване на чашковидните клетки и единични крипт абцеси. Изразен възпалителен инфилтрат в lamina propria, мускуларис мукозе и субмукоза и задебеляване на m. propria. Възпалителният инфилтрат е хронично обострен с проеобладаване на Ео левкоцити.



Фиг. 53. Хистологично изследване на плъхове, третирани с DNBS, с последващо приложение на U-74389G, показва възстановяване на мукозната архитектура и намаляване на клетъчния инфилтрат, абсцесите на криптите и деплещията на чашковидните клетки (оцветяване хематоксилин-еозин, увеличение x100).

Дискусия. В настоящето проучване оценихме защитният ефект на 21-аминостероида **U-74389G** при индуциран от DNBS колит при плъхове. Нашите данни показват, че U-74389G подобрява клиничните симптоми, макроскопските и хистологичните увреждания на дебелото черво.

ВЧЗ се счита за многофакторно заболяване поради взаимодействието между имунната система, генетичното предразположение, реакциите към околната среда и микробните фактори [Farzaei MH et al., 2016]. В литературата има данни, подкрепящи значителната роля на свободните радикали, както в развитието на ВЧЗ, така и във фармакологичните цели за ограничаване ефекта им при разработване на лекарства против ВЧЗ [Piechota-Polanczyk A et al., 2014]. Оксидативният дисбаланс индуцира и влошава заболяването по два начина, включително оксидативно увреждане на клетките на чревната лигавица и повишено образуване на възпалителни цитокини. Използван е модел на индуциран от хаптен експериментален DNBS колит. Агресивният агент се разтваря в алкохол, което подобрява проникването на DNBS в lamina propria [Kim JJ et al., 2012]. След това DNBS хаптенизира локалните микробни протеини, те стават имуногенни и провокират имунни отговори на гостоприемника, инфилтрация на неутрофили, макрофаги и Т-лимфоцити.

Индуцираното от DNBS-хаптен възпаление включва специфични клетки, включително полиморфонуклеарни неутрофили, лимфоцити, плазмени клетки и еозинофили [Sanchez-Muñoz F et al., 2008]. Възпалителните клетки могат да причинят увреждане на тъканите чрез освобождаване на свободни кислородни радикали, протеази и възпалителни медиатори като цитокини и хемокини.

Резултатите от нашето проучване показват, че интаректалното приложение на DNBS в доза от 30 mg, разтворен в 0,25 ml 50% етанол, предизвиква възпаление, наподобяващо ВЧЗ. Клиничният ход, имунологията и хистопатологията на промените ни дадоха основание да приемем, че този модел е подходящ за изследване на ефекта на потенциални терапевтични средства.

Наблюдавахме, че DNBS причинява значителна загуба на тегло, намален прием на храна и сериозни промени в консистенцията на изпражненията, включително наличието на кръв при всички колитни плъхове, без смъртност сред животните. През 5-те дни след индуцирането на колит, третирани с DNBS плъхове показват значително намаляване на телесното тегло и консумацията на храна, най-изразено на ден 3 ($P < 0,05$). В същото време тези показатели се повлияват благоприятно от U-74389G и стойностите им са значително повишени в сравнение с групата DNBS. На 3-тия ден след въвеждането на агресивния агент са наблюдавани редки изпражнения при 33%, диария при 67% от животните и наличие на кръв в изпражненията при 37,5% от плъховете с колит. Само един плъх в групата, лекувана с U-74389G, имаше диария и беше положителен за наличие на кръв в изпражненията на ден 3.

Макроскопската оценка на тъканите, получени от животни, третирани с U-74389G, показва, че при 50% ($n=4$) от животните има хиперемия, а при 3 плъха има язви без възпалителна реакция. Значително по-тежки са промените при животните с колит, като при 7 от 8 животни има язвени промени с възпаление и големи лезии.

Цитокините са важни в патогенезата на ВЧЗ и регулацията на техния синтез успешно намалява тежестта на заболяването и поддържа ремисия. Активирани имунни клетки отделят няколко цитокина, които активно регулират възпалителния отговор при предизвикания колит. Веднъж секретирани от антиген представящите клетки, тези цитокини задействат и диференцират много Т-клетки, активирайки адаптивния имуноен отговор. Експресията на TNF- α в макрофагите е открита в тъканите на дебелото черво и серумните нива на TNF- α корелират с клиничните и лабораторни показатели за активността на чревното заболяване [Sanchez-Muñoz F et al., 2008]. В допълнение към TNF- α , IL-1 и IL-6 имат изразена провъзпалителна активност. Те се произвеждат от различни типове клетки чрез инициране на циклооксигеназа тип 2, фосфолипаза А и индуцируема азотен оксид синтаза и участват в имунологични реакции при развитието на ВЧЗ. IL-10 има противовъзпалителни и имunosупресивни свойства. Той намалява както представянето на антигени, така и последващото освобождаване на провъзпалителни цитокини, като по този начин отслабва възпалението на лигавицата. Повишаване на серумните концентрации на възпалителни цитокини TNF- α , IL-1 и IL-6 и понижено ниво на противовъзпалителен цитокин IL-10 на ден 6 след индукция на колит е установено

при плъхове, третирани с DNBS. U-74389G значително повлиява концентрацията на цитокините в подкрепа на твърдението, че този аминокостероид произвежда противовъзпалителни ефекти.

В нашето проучване сравнихме ефектите на U-74389G с ефектите на **сулфасалазин (SS)** върху маркерите за активност на заболяването, макроскопско оценяване на увреждане на дебелото черво, имунологични параметри и хистологични промени. Сулфасалазин е изследван при ВЧЗ и има доказана ефикасност при предизвикване на ремисия при леко до умерено заболяване, както и при поддържане на ремисия [Das KM et al., 2000]. SS има противовъзпалително, имunosупресивно и антибактериално действие, което се дължи главно на неговите разпадни продукти сулфапиридин и 5-аминосалицилова киселина. Ефектите на SS върху изследваните маркери са по-слабо изразени в сравнение с тези на U-74389G. Тези експериментални открития могат да се обяснят с факта, че може да отнеме седмици, за да настъпят ефектите на SS.

Целта на терапията на ВЧЗ е модулиране на възпалителния отговор. Въпреки използването на различни терапевтични групи, включително биологични, не всички пациенти получават задоволителен резултат от терапията [Tanida Set al., 2015]. Глюкокортикостероидите (GCS) са ефективни при лечението на ВЧЗ за контролиране на екзацербацията на заболяването и за предизвикване на ремисия. GCS, взаимодействащи с техните рецептори, модулират имунния отговор. Те инхибират експресията на адхезионни молекули и движението на възпалителни клетки към целевите тъкани, включително червата [Hayashi R et al., 2004; Braugher JM et al., 1988]. GCS не могат да бъдат препоръчани за предотвратяване на рецидиви на заболяване поради техния профил на безопасност и несигурни данни за ефикасност [Marebian J et al., 2009].

Фамилията 21-аминокостероиди, аналози на метилпреднизолон, са разработени като съединения с ефекти на неутрализиране на свободни радикали и мембранно стабилизиращи активности и липса на глюкокортикоидна активност поради заместването на 11- β -хидрокси групата. 21-аминокостероидите включват тирилазад, U-74389G (16-десметил-тирилад) и др. Те са тествани за способността да инхибират пероксидацията на липидите в тъканите след различни видове увреждания [Jacobsen EJ et al., 1990; Hall ED et al., 1994; Muller TB et al., 1995]. Доказано е, че U-74389G има невропротективни свойства при модел на инсулт [Fabian RH et al., 1998] и увреждане на мозъка [Shi F et al., 1995]. Той също така инхибира липидната пероксидация в култивирани ендотелни клетки [Antonini JM et al., 1995], и е с протективни ефекти при други модели на множество органи увреждания, като например в белите дробове, сърцето и реперфузионното увреждане на скелетните мускули [Remmers D et al., 1996]. Лазароидите имат висок афинитет към мембранните липиди и чрез включване в липидния двоен слой поради тяхната липофилност, те проявяват стабилизиращи клетъчната мембрана ефекти [Kavanagh RJ et al., 2000]. Протониращият пиперазинов азот взаимодейства с отрицателно заредени фосфат-съдържащи главни групи на мембранный липиден двоен слой. Това действие ограничава движението на липидните пероксидни радикали в мембраната, като по този начин намалява тяхното взаимодействие с мастни киселини и инхибира липидната пероксидация.

U-74389 инхибира първоначалното възпаление, включително миграцията и активирането на възпалителните клетки [Huang H et al., 2001]. Нови експериментални резултати показват, че лазароидите са мощни, зависими от времето инхибитори на каспаза-1, които превръщат неактивния IL-1 β в активен цитокин [Kawarski M et al., 2015].

В заключение, интаректалното приложение на DNBS предизвиква тежки увреждания на дебелото черво при плъхове, оценени чрез маркери за активност на заболяването, макроскопско оценяване на увреждане на дебелото черво, имунологични параметри и хистологични промени. Нашето проучване показва, че благоприятните ефекти на 21-аминокостероид U-74389G може да се дължат на мембранно стабилизиращата активност, противовъзпалителните и антиоксидантните свойства на лазароида.

3. ИЗВОДИ

I. Модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност

1. Двукратното интратрахеално приложение на амиодарон (6,25 mg/kg, дни 0 и 2) предизвиква възпроизводим модел на белодробна токсичност с по-нисък леталитет в сравнение с еднократното приложение (M1) и е препоръчителен модел за по-нататъшни изследвания.
2. Лазароидът U-74389G доза 5 mg/kg, приложен преди и след интратрахеална инстилация на амиодарон, значително редуцира ранния белодробен възпалителен отговор – намалява протеиновото съдържание и броя на полиморфонуклеарните левкоцити в БАЛТ на 3-тия и 7-ия ден, ефект, съпоставим с този на преднизолон.
3. U-74389G не предотвратява ранното повишение на активността на LDH и AIPh в БАЛТ, което вероятно се дължи на директния цитотоксичен ефект на амиодарон, проявяващ се преди постигане на оптимална белодробна концентрация на аминостероида.
4. Интратрахеалното приложение на амиодарон потиска активността на супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза, като U-74389G смекчава тези промени, показвайки умерена антиоксидантна протекция на ензимната защитна система в белодробния паренхим.
5. U-74389G значително инхибира индуцираната от амиодарон липидна пероксидация – снижава нивата на MDA в белодробния хомогенат и хидропероксид в плазмата на 7-ия ден.
6. На 14-ия и 28-ия ден U-74389G значително намалява съдържанието на хидроксипролин и колаген в белодробния хомогенат в сравнение с групата само с амиодарон, показвайки значим инхибиторен ефект върху развитието на белодробна фиброза, леко превъзхождащ ефекта на преднизолон.
7. Хистопатологичното изследване потвърждава биохимичните данни – в групата с AM + U-74389G е налице значително по-слабо изразена интерстициална и перивазална фиброза на 28-ия ден в сравнение с групата само с амиодарон.

II. Модел на DNBS-индуциран колит

1. DNBS в доза 30 mg, разтворен в 0,25 ml 50% етанол и приложен интраректално, предизвиква възпроизводим колит при всички опитни животни и е подходящ модел за изследване на ефекта на потенциални лекарства. Дозите от 10 mg и 20 mg DNBS не индуцират колит при 37,5% от животните и са неподходящи за тази цел.
2. U-74389G в доза 5 mg/kg, приложен интраперитонеално за 6 дни, значително подобрява клиничните индикатори за активност на заболяването – телесно тегло, прием на храна и диарийен индекс при плъхове с DNBS-индуциран колит.
3. U-74389G значително намалява макроскопските белези на увреждане на дебелото черво (язвен индекс и общ макроскопски score), с ефект, превъзхождащ този на сулфасалазин в условията на 6-дневния протокол.
4. U-74389G потиска серумните нива на провъзпалителните цитокини TNF- α , IL-1 β и IL-6, и значително повишава нивата на противовъзпалителния IL-10 в сравнение с DNBS групата, демонстрирайки изразен имуномодулиращ ефект.
5. U-74389G нормализира нивата на малонов диалдехид (MDA) в серума до стойности, неразличими от тези в контролната група, доказвайки мощен антиоксидантен ефект при DNBS-индуциран колит.

6. Хистологичното изследване установява значително по-слабо изразена мукозна некроза, клетъчна инфилтрация и оток при животните, третирани с U-74389G, в сравнение с DNBS групата, с данни за частично възстановяване на архитектурата на лигавицата.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящото проучване за първи път системно изследва ефектите на лазароида U-74389G в два различни експериментални модела – амиодарон-индуцирана белодробна токсичност и DNBS-индуциран колит при плъхове.

Резултатите показват, че U-74389G упражнява значими противовъзпалителни, антиоксидантни и антифибротични ефекти и в двата модела. При белодробната токсичност аминостероидът ефективно ограничава ранния възпалителен отговор и достоверно инхибира развитието на белодробна фиброза – ефект, сравним със стандартното кортикостероидно лечение с преднизолон, без присъщите на глюкокортикостероидите нежелани ефекти. При колита U-74389G демонстрира комплексен протективен ефект – клиничен, макроскопски, имунологичен, биохимичен и хистологичен – превъзхождащ ефекта на сулфасалазин в рамките на прилагания протокол.

Механизмите, лежащи в основата на тези ефекти, включват: инхибиране на липидната пероксидация чрез улавяне на пероксилни радикали, стабилизиране на клетъчните мембрани посредством взаимодействие с фосфолипидния бислой, потискане на провъзпалителни медиатори и имуномодулиращо действие. Тези свойства позиционират U-74389G като перспективна молекула за допълнително изследване при хронични оксидативно-медиирани и фибро-инфламаторни заболявания.

НАУЧНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. За първи път е систематично сравнена ефикасността на лазароида U-74389G и преднизолон при амиодарон-индуцирана белодробна токсичност при плъхове – установено е, че протективният ефект на U-74389G по отношение на маркерите за белодробна фиброза (хидроксипролин, колаген) е сравним, а по някои показатели леко превъзхождащ ефекта на преднизолон.
2. За първи път е изследван ефектът на U-74389G в DNBS-индуциран модел на колит при плъхове, като е демонстриран комплексен протективен ефект – клиничен, макроскопски, имунологичен (цитокени), антиоксидантен (MDA) и хистологичен.
3. Установено е, че U-74389G нормализира серумните нива на малонов диалдехид при DNBS-индуциран колит до стойности, неразличими от контролата, което доказва пълна антиоксидантна протекция срещу DNBS-индуцирания оксидативен стрес.
4. Документирано е, че U-74389G потиска значимо провъзпалителните цитокини (TNF- α , IL-1 β , IL-6) и повишава IL-10 при DNBS-индуциран колит, с ефект, превъзхождащ сулфасалазин в прилагания 6-дневен протокол.

Приноси с потвърдителен и научно-приложен характер

5. Потвърдено е, че двукратното интратрахеално приложение на амиодарон (дни 0 и 2, 6,25 mg/kg) представлява по-безопасен и подходящ модел на АИБТ в сравнение с еднократното приложение в по-висока концентрация.
6. Доказано е, че DNBS в доза 30 mg, интраректално, е оптималната доза за индуциране на възпроизводим и тежък колит при плъхове от порода Wistar, подходящ за фармакологични изследвания, докато дозите от 10 и 20 mg осигуряват непълна пенетрантност.
7. Разширени са данните за антифибротичния потенциал на лазароидите при белодробни увреждания, като е установено, че U-74389G значително инхибира отлагането на колаген и повишаването на хидроксипролин след интратрахеално приложение на амиодарон.

СПИСЪК НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

1. Plamen K. Krastev, Alexander B. Blazhev, Galya Ts. Stavreva. EFFECT OF AMINOSTEROID U-74389G IN A MODEL OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE IN RATS. Journal of Biomedical and Clinical Research (ISSN 1313-6917), Vol.14, Number 2, 2021 (eISSN 1313-9053), pp. 131-139
2. Кръстев Пламен, Виолета Данчева, Галя Ставрева. Сравнително изследване на ефекта на U-74389G и преднизолон при индуцирана от амиодарон белодробна токсичност. VIII национален конгрес по фармакология, клинична фармакология и терапия с международно участие, 15-17 ноември 2024, МУ-Плевен, Сборник доклади, стр.194-204
3. Galya Ts. Stavreva, Violeta Y. Dancheva, Lyudmil G. Terziev, Plamen K. Krastev. Effects of 21-aminosteroid U-74389g on amiodarone-induced pulmonary toxicity in rats. Archives of the Balkan Medical Union vol. 54, no. 3, pp. 404-410 September 2019