

О.С.Попов
І.А. Зупанець
С.К. Шебеко

Національний фармацевтичний університет,
Харків

Ключові слова: Диклокор, диклофенак, кверцетин, колаген-індукований артрит, морфологія.

Надійшла: 07.09.2015

Прийнята: 24.09.2015

УДК [615.276:615.453.42]:57.084.1

МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПРЕПАРАТУ “ДИКЛОКОР” НА ПЕРЕБІГ КОЛАГЕН-ІНДУКОВАНОГО АРТРИТУ У ЩУРІВ

Реферат. Метою роботи було морфологічне вивчення впливу Диклокору на перебіг колаген-індукованого артрит у щурів в порівнянні з диклофенаком натрію та кверцетином. Аутоімунний артрит відтворювали шляхом підшкірного введення колагену II типу („Sigma-Aldrich”, США). Морфологічні дослідження проводили за допомогою стандартних методів світлової мікроскопії. Результати і висновки: диклокор і диклофенак натрію чинять виражений нормалізуючий вплив на морфологічні зміни у суглобах щурів, в той час як кверцетин проявляє меншу активність.

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 3. – С. 58-66.

© О.С.Попов, І.А.Зупанець, С.К.Шебеко, 2015

✉ oleksii.s.popov@gmail.com

Popov O.S., Zupanets I.A., Shebeko S.K. Morphological study of the effect of the drug "Dicloror" in the course of collagen-induced arthritis in rats.

ABSTRACT. Background. Since NSAIDS have some detrimental side effects, studying new combinations of NSAIDS with other substances could provide a reduction of the dosage of the NSAID while retaining therapeutic effectiveness. **Objective.** To study the effect of Dicloror on the cartilage morphology in the course of collagen-induced arthritis in rats in comparison with sodium diclofenac and quercetin. **Methods.** Autoimmune arthritis was reproduced by subcutaneous injections of type II collagen ("Sigma-Aldrich", USA). Morphological studies were performed using standard light microscopy techniques. **Results.** After treatment with both Dicloror and diclofenac sodium no cartilage destruction was observed and tissue hyperplasia was low. Some residual effects were observed in the synovial membranes in the Dicloror group, and in periarthritic tissues – in the diclofenac sodium group. Under the action of quercetin, there was a sufficiently high level of hyperplastic processes and pannus formation in synovium. **Conclusion.** Dicloror and diclofenac sodium express a profound normalizing effect, while Quercetin is less active.

Key words: Dicloror, diclofenac sodium, quercetin, collagen-induced arthritis, morphology.

Citation:

Popov OS, Zupanets IA, Shebeko SK. [Morphological study of the effect of the drug "Dicloror" in the course of collagen-induced arthritis in rats]. *Morphologia*. 2015;9(3):58-66. Ukrainian.

Вступ

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) є однією з самих широко застосовуваних груп лікарських засобів в клінічній практиці, проте не дивлячись на безперечну клінічну ефективність, їх застосування пов'язане з високим ризиком розвитку побічних ефектів, які в цілому зустрічаються в 25% випадків, а в 5% – складають серйозну загрозу життю [1].

Одним з варіантів вирішення вищевикладеної проблеми є вивчення нових комбінацій НПЗП з речовинами, що зменшують їх хондротоксичний вплив, завдяки наявності антиапоптозних, антиоксидантних і антигіпоксичних властивостей [2, 3]. У зв'язку з цим науковий інтерес представляє препарат „Диклокор”.

Метою представленого дослідження стало морфологічне вивчення впливу Диклокору на перебіг колаген-індукованого артрит у щурів в

порівнянні з диклофенаком натрію та кверцетином.

Матеріали та методи

Біоетика. Усі дослідження проводились у відповідності з директивою Ради ЄС 2010/63/EU про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети [4, 5]. План представленого дослідження було затверджено Комітетом з біоетики Національного фармацевтичного університету.

Об'єкт дослідження. Оригінальний препарат „Диклокор” – капсули для перорального застосування (270 мг капсульної маси) виробництва ПАТ НВЦ „Борщагівський ХФЗ” (Україна). Склад (на 1 капсулу): - кверцетин 40 мг - диклофенак натрію 25 мг.

Об'єкти порівняння. 1. „Кверцетин” – гра-

нули для перорального застосування, що містять 4г кверцетину у 100г гранул, виробництва ПАТ НВЦ „Боршагівський ХФЗ” (Україна). 2., „Вольтарен” – таблетки вкриті оболонкою, що містять 50 мг диклофенака натрія (ДН), виробництва Novartis Pharma (Швейцарія).

Дизайн експерименту. Дослідження впливу Диклокору на перебіг колаген-індукованого артриту (КІА) проведено на 50 білих нелінійних щурах обох статей масою 180-200 г, що розподілялись на 5 дослідних груп по 10 тварин у кожній: 1 група – інтактний контроль; 2 група – контрольна патологія; 3 група – тварини, що отримували Диклокор у дозі 17,8 мг/кг; 4 група – тварини, що отримували кверцетин у дозі 11,0 мг/кг (відповідає дозуванню кверцетина в Диклокорі) та 5 група – тварини, що отримували ДН у дозі 6,8 мг/кг (відповідає дозуванню ДН в Диклокорі).

У перший день експерименту у щурів відтворювали аутоімунний артрит шляхом підшкірного введення в основу хвоста емульгованої суміші 0,2 % розчину бичачого колагену II типу („Sigma-Aldrich”, США) в 0,1 М оцтовій кислоті та повного ад’юванта Фрейнда („Sigma-Aldrich”, США) в співвідношенні 1:1 в дозі 2 мг/кг за колагеном [6]. Через тиждень для потенціювання аутоімунного процесу введення іму-

нізуючої суміші повторювали таким же чином і в тій же дозі. Після закінчення латентного періоду (через 10-14 днів) у тварин розвивався поліартрит задніх і передніх кінцівок. Починаючи з 14 дня експерименту і впродовж 2-х тижнів, всі тварини отримували відповідні лікарські препарати щодня перорально 1 раз на добу у вигляді водних суспензій. На 28-у добу експерименту тварин піддавали декапітації під ефірним наркозом з метою проведення морфологічних досліджень суглобового хряща щурів за допомогою стандартних методів світлової мікроскопії [Ошибка! Источник ссылки не найден.7, 8].

Для об’єктивізації спостережень проводили морфометричні вимірювання. За допомогою окуляра-мікрометра на мікропрепаратах визначали товщину хряща, яку виражали в умовних одиницях; підраховували щільність розташування хондроцитів в умовній одиниці площі.

Статистична обробка даних. Отримані цифрові результати обробляли із застосуванням непараметричного аналогу однофакторного дисперсійного аналізу – критерію Крускала-Уолліса [4, 9].

Результати та їх обговорення

Обчислені морфометричні показники представлені в таблиці 1.

Таблиця 1
Морфометричні показники суглобів щурів з колаген-індукованим артритом під впливом Диклокору та референтних об’єктів (n=50)

Показник	Дослідна група	Інтактний контроль (вихідні дані)	Контроль-на патологія (14 доба)	Контроль-на патологія (28 доба)	Диклокор (28 доба)	Кверцетин (28 доба)	ДН (28 доба)
Товщина хряща, умов. од.		17,73±2,75	13,11±4,45	13,60±3,27	15,48±4,06	13,47±3,03	14,68±4,36
Клітинна щільність на умов. од. площі		32,70±6,61	20,67±4,37	22,60±5,65	26,83±3,78	25,67±5,54	27,50±5,35
Синовіт (% тварин)		0	83,3	50	33,3	33,3	0
Гіперплазія синовіальної оболонки (% тварин)		0	33,3	66,6	16,6	66,6	16,6
Деструкція і дистрофія хряща (% тварин)		0	33,3	66,6	0	0	0
Панус (% тварин)		0	66,6	66,6	0	33,3	33,3

Примітки: • – вірогідно відносно інтактних тварин; * – вірогідно відносно групи контрольної патології станом на 14 добу дослідження; ** – вірогідно відносно групи контрольної патології станом на 28 добу дослідження.

Інтактний контроль

Суглобова поверхня кісток гомілковостопного суглоба інтактних щурів покрита гіаліновим хрящем, що має виражену зональну будову. У зовнішній зоні клітини ізольовані, дрібні, сплюснені, в середній – розташовані колонками перпендикулярно поверхні. Хондроцити в цій зоні

округлі, великі, з високим ядерно-цитоплазматичним відношенням, зустрічаються ізогенні групи з 2-3 клітин. Цитоплазма їх слабобазофільна. Глибинна зона містить дрібні хондроцити.

Забарвлення міжклітинної речовини рівномірне, інтенсивність її зростає у напрямку до субхондральної кістки (рис. 1а). Сама кістка має

типову для губчастої кістки будову. В осередках переплєтених трабекул міститься активний поліморфноклітинний кістковий мозок. У суглобовій сумці синовіальні оболонки ареолярного типу виступають у суглобову порожнину у вигляді клиноподібних складок. Синовіоцити групуються досить близько один до одного, на деяких ді-

лянках лежать в 3-4 ряди. Субсиновіальна тканина достатньо бідна клітинами, там переважають сполучнотканинні волокна (рис. 1б, в). Периартикулярні тканини без ознак запалення, м'язові волокна рівномірно забарвлені, посмугованість в них добре виражена.

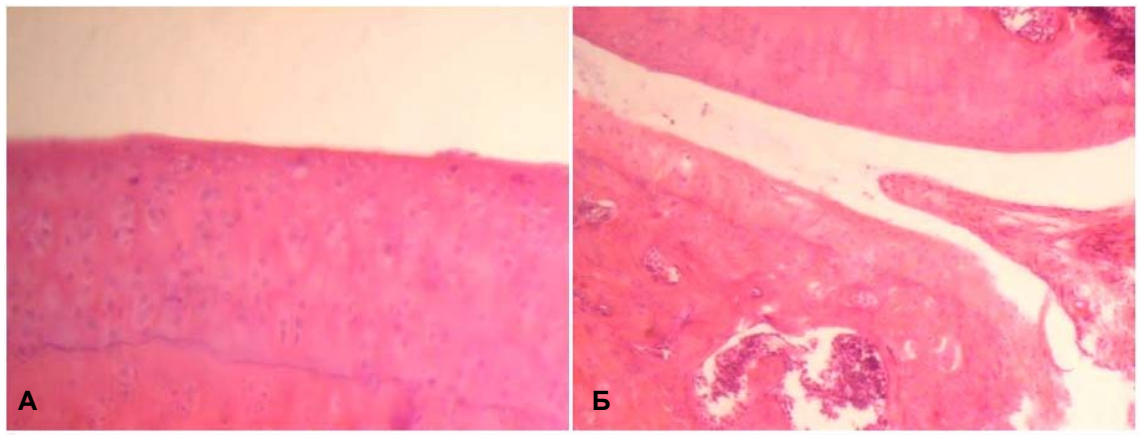


Рис. 1. Морфоструктура колінного суглоба інтактних щурів. А. Гіаліновий хрящ суглобової поверхні, виразно видно зональність розташування хрящових клітин. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 250$. Б. Синовіальна оболонка ареолярного типу виступає в порожнину клиноподібною складкою, клітинність її помірна. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 150$.

Контрольна патологія

В ході дослідження колінних суглобів щурів, проведеного на 14 та 28 добу після відтворення патології, виявлявся якісно однаковий патологічний процес, що характеризується розвитком проліферативних і запальних процесів в капсулі і порожнині суглоба, появою гіперпластичних, деструктивних і дистрофічних явищ. Вражаються як сам хрящ, так і периартикулярні тканини, в т.ч. й м'якотканинні структури – синовіальні оболонки, зв'язки та м'язи.

В той час як на 14 день дослідження більш вираженими були гострі запальні процеси, на 28 день на перший план виступають проліферативні і деструктивно-дистрофічні процеси в хрящі і м'якотканинних структурах. У гіперплазованих, грубих, щільних синовіальних оболонках переважають не лейкоцити, а гістіоцити, фібробласти різного ступеня зрілості, зустрічаються дифузно розташовані зрілі лімфоцити, що відповідає картині продуктивного синовіту (рис. 2а, б).

Крайові синовіоцити лежать у декілька рядків, судини часто розширені і кровонаповнені. У однієї з тварин відмічений ексудативний синовіт, що супроводжується масивним білковим випотом. Крупні порожнини з пристінковим білковим випотом виявляються не тільки в синовії, але й у тканині кісткового мозку (рис. 2в, г).

У 67 % щурів гіперплазовані ворсинки з продуктивним синовітом утворюють масивні пануси, які нашаровуються з боків на суглобовий

хрящ, зростаються з ним (рис. 3а, б).

Поблизу таких панусів виявлялися ділянки суглобового хряща з найбільш вираженими деструктивними і дистрофічними змінами: набряками, набуханням, втратою структури і появою безклітинних ділянок з порушеним сприйняттям забарвлення тканинами (рис. 3в, г). Зрідка в таких ділянках можна було зустріти лейкоцити. Подібний деструкції піддавався й хрящ з паросткової зони. У ряді випадків панус не тільки інвазує хрящ, обширні розростання грануляційної тканини проникають глибоко в хрящову тканину, заміщаючи її, на поверхні при цьому скупчується випіт. У частині суглобів відмічено руйнування належної субхондріальної кістки і вакантне заміщення зруйнованих ділянок сполучною тканиною (рис. 4а, б).

Периартикулярні тканини також залучаються до запального процесу: м'язові волокна набрякли, із спотвореними тинкторіальними властивостями. У кровотворній тканині кісткового мозку виявляються не тільки набряки, але й розширені кровонаповнені судини (рис. 4в, г).

Диклокор

У групі щурів з КІА під впливом Диклоко-ру завершення патологічного процесу хрящовою деструкцією виявлено не було, що свідчить про запобігання розвитку деструктивно-дистрофічних процесів в хрящовій тканині. Сам суглобовий хрящ звужений в порівнянні з інтактним контролем, але має нормальну будову (рис. 5а).

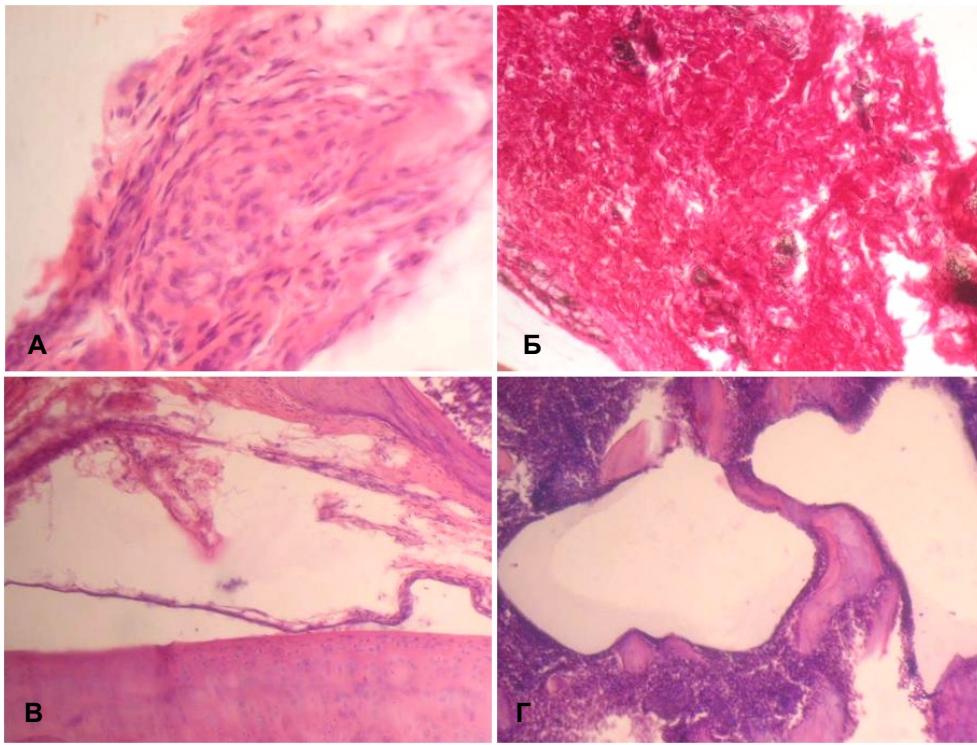


Рис. 2. Морфоструктура колінного суглоба щурів з KIA на 28 добу дослідження. А. Проліферація гістіоцитів і волокон синовіальної оболонки. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$. Б. Гіперплазована щільна синовіальна оболонка. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізеном. $\times 200$. В. Білковий випіт у порожнинах синовіальної оболонки. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 150$. Г. Порожнини, заповнені білковим випотом у кістковому мозку. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 150$.

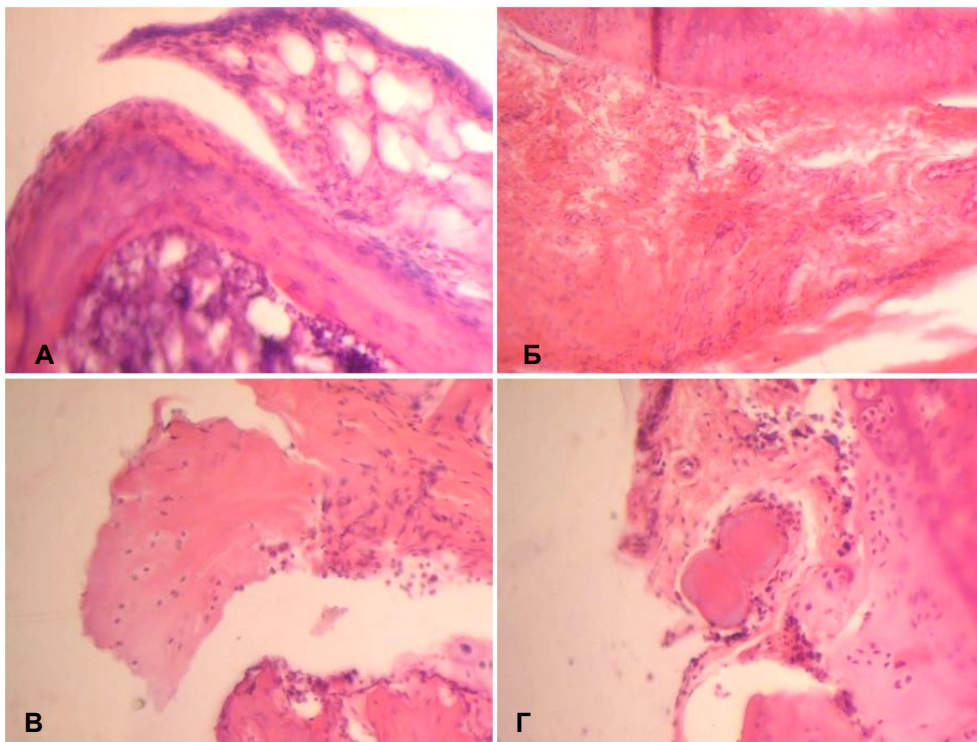


Рис. 3. Морфоструктура колінного суглоба щурів з KIA на 28 добу дослідження. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$. А. Гіперплазована синовіальна оболонка формує панус на поверхні хряща. Б. Панус щільно зростається з суглобовою поверхнею. В. Безструктурні, набряклі, зруйновані ділянки суглобового хряща. Г. Безструктурні, набряклі, зруйновані ділянки суглобового хряща, забарвлення змінене, видно рідкісні лейкоцити. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$.

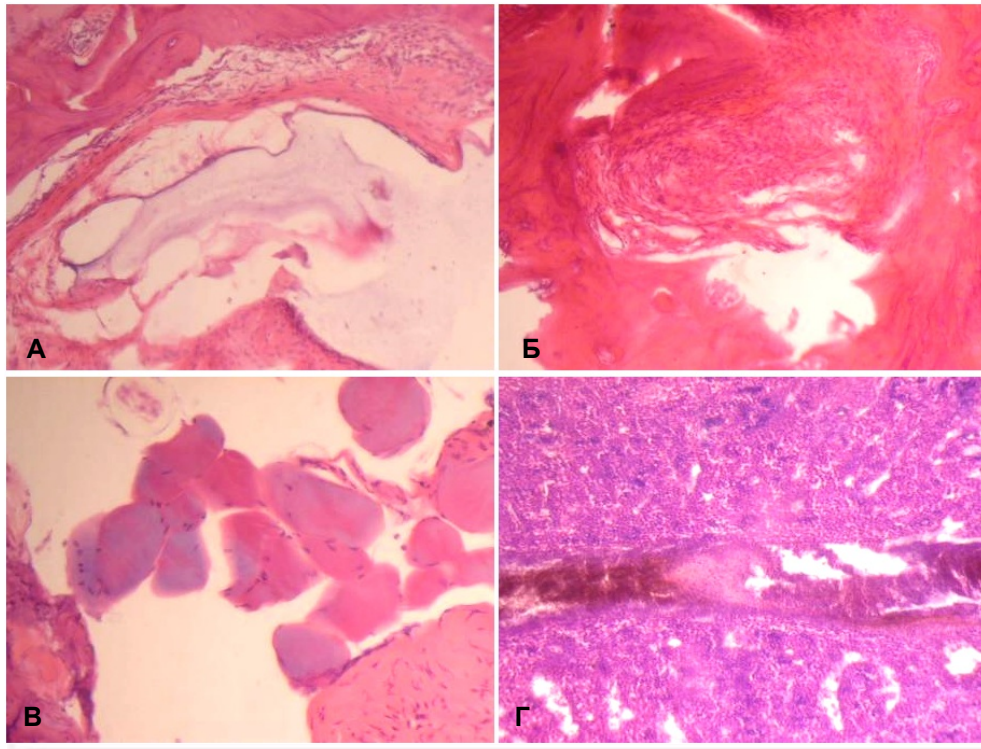


Рис. 4. Морфоструктура колінного суглоба щурів з KIA на 28 добу дослідження. Гематоксилін-еозин. А. Заміщення ділянки суглобового хряща сполучною тканиною, випіт на поверхні. $\times 200$. Б. Заміщення ділянки зруйнованої субхондріальної кістки сполучною тканиною. $\times 200$. В. Набряклі базофільні м'язові волокна. $\times 150$. Г. Розширена повнокровна судина в кістковомозковій порожнині. $\times 150$.

Щільність розташування хондроцитів вище за щільність хондроцитів у нелікованих щурів на 22 % (табл. 1). Синовіальні оболонки мають нормальну будову у 67 % тварин (рис. 5б). Гіперплазія покривних тканин відмічена в одному спостереженні, продуктивний синовіт – в 33 %

випадків. Причому, в синовіальних оболонках відмічена змішана клітинна інфільтрація: серед гістіоцитів і фібробластів можна знайти і лейкоцитарні клітини. Судини синовія іноді розширені і кровонаповнені (рис. 6а,б).

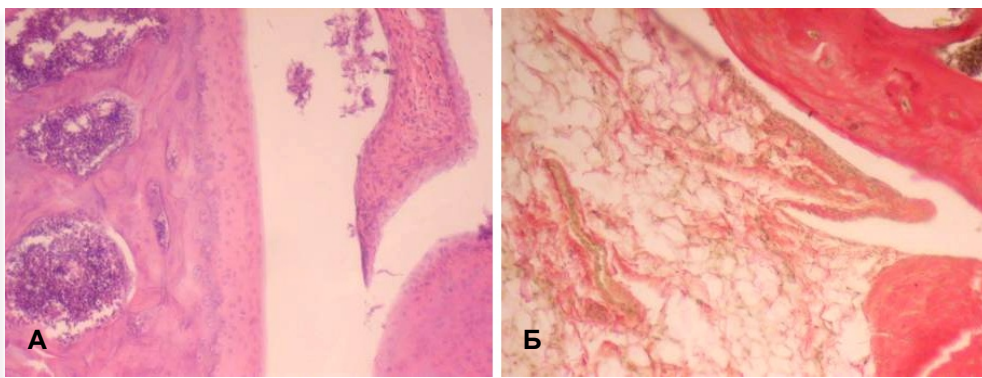


Рис. 5. Морфоструктура колінного суглоба щурів з KIA під впливом Диклофору станом на 28 добу експерименту. А. Нормальна будова суглобового хряща і синовіальної оболонки. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 150$. Б. Відсутність ознак гіперплазії синовія. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. $\times 150$.

Кверцетин

Введення кверцетину з лікувальною метою запобігає розвитку деструкції суглобових тканин на тлі патологічного процесу. Цілісність хрящового покриття збережена, хоча сам хрящ, як і раніше, звужений, щільність розташування хрящових

клітин має тенденцію до підвищення, проте не істотно відрізняється від показників 28-го дня нелікованих тварин (табл. 1). Гіперплазія покривних тканин без явищ синовіту або із слабкими його проявами відмічена у 67 % спостережень (рис. 7а, б), продуктивний синовіт – у 33 %. Серед

клітин проліферату переважають численні фібробласти і гістіоцити, причому часто дистрофічно змінені – з вакуолізованою цитоплазмою (рис. 8а). Судини синовію розширені, містять в просвітах еритроїдні маси з істотною домішкою лейкоцитів (рис. 8б). Крайові синовіоцити також проліферу-

ють і утворюють щільну темну облямівку (рис. 7а). Удвічі проти позитивного контролю знижується число випадків, коли гіперплазований синовій формуює панус, що контактує з хрящовою поверхнею (рис. 9а).

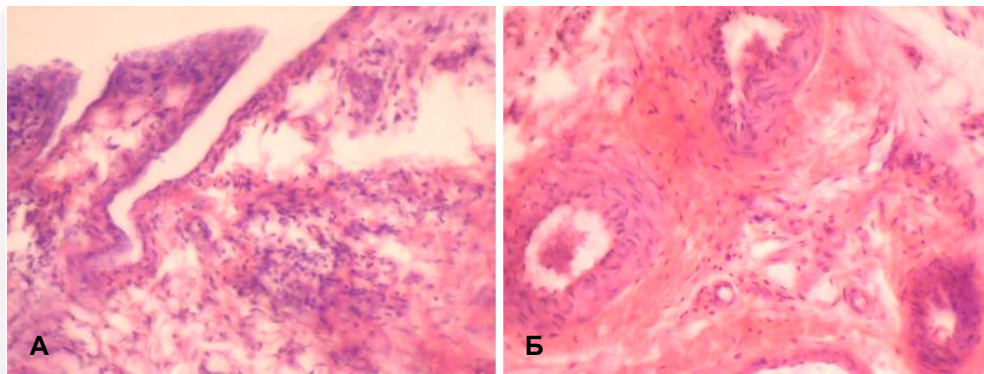


Рис. 6. Морфоструктура колінного суглоба щурів з КІА під впливом Диклофору станом на 28 добу експерименту. А. Продуктивний синовіт зі змішаною клітинною інфільтрацією. Б. Гіперплазія синовія, судини кровонаповнені. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 150$.

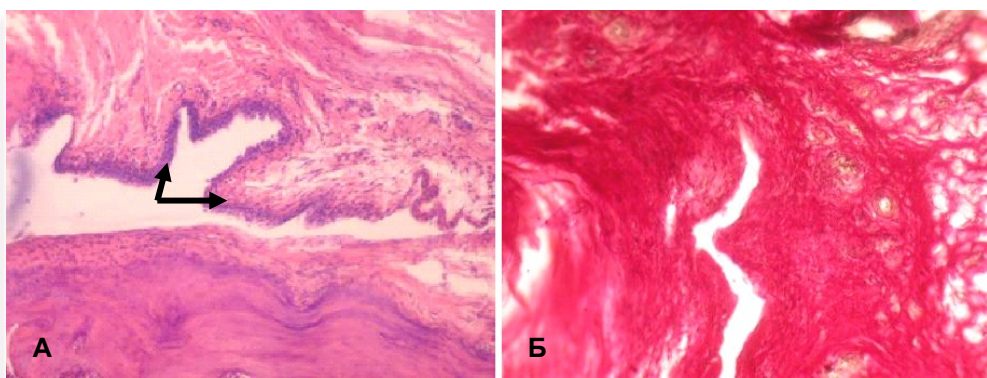


Рис. 7. Морфоструктура колінного суглоба щурів з КІА під впливом кверцетину станом на 28 добу експерименту. А. Проліферація крайових синовіоцитів (стрілки). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 150$. Б. Гіперплазія синовіальної оболонки. Забарвлення пікрофуксиним за Ван-Гізеном. $\times 200$.

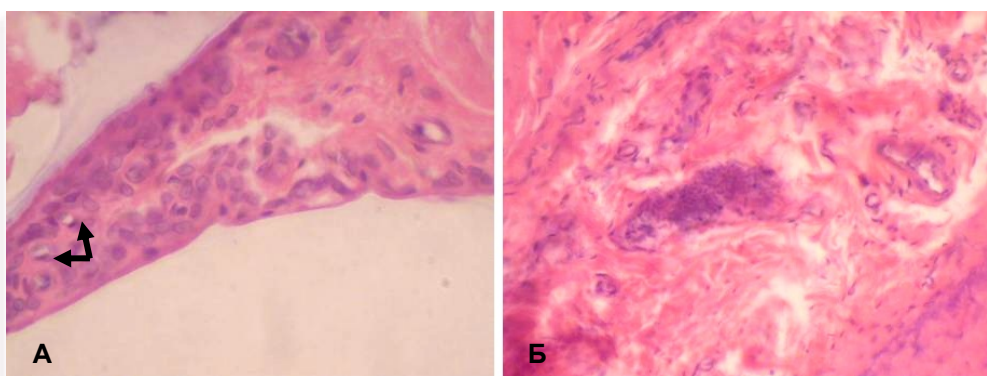


Рис. 8. Морфоструктура колінного суглоба щурів з КІА під впливом кверцетину станом на 28 добу експерименту. А. Проліферація гістіоцитів синовію, цитоплазма клітин вакуолізована (стрілки). Б. Щільна гіперплазована синовіальна оболонка з розширеними кровонаповненими судинами. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$.

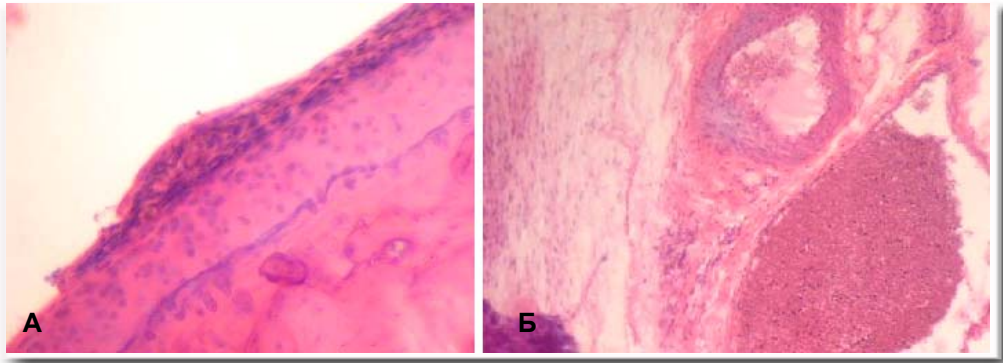


Рис. 9. Морфоструктура колінного суглоба щурів з КІА під впливом кверцетину станом на 28 добу експерименту. А. Панус, що наповзає на поверхню звуженого хряща. Б. Гострі мікроциркуляторні порушення в периартикулярних тканинах. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 150$.

У периартикулярних тканинах як і раніше відмічаються гострі мікроциркуляторні порушення, що виявляються в розширенні і повнокров'ї судин різного діаметру, виході клітинних елементів крові до периваскулярного простору (рис. 9б).

Диклофенак натрію

Тривале введення ДН, як і у випадку Диклорору, практично повністю запобігає розвитку деструктивно-дистрофічних процесів в хрящовій тканині. Суглобовий хрящ мав рівну поверхню, хондроцити розташовувалися рівномірно серед

однорідної проміжної речовини. Щільність розташування клітинних елементів вище за показники щурів з КІА того ж терміну на 20 %, товщина хряща також збільшується, хоча і не так істотно (табл. 1). Синовіальна оболонка за клітинним складом представлена синовіоцитами і фіброblастами, ознак запалення не має, проліферація синовіоцитів по краю ворсинок відмічена лише у 1-ої тварини (рис. 10а, б; 11а). У 33 % випадків синовій формувє вузький бічний панус, який щільно прилипає до хряща (рис. 11б).

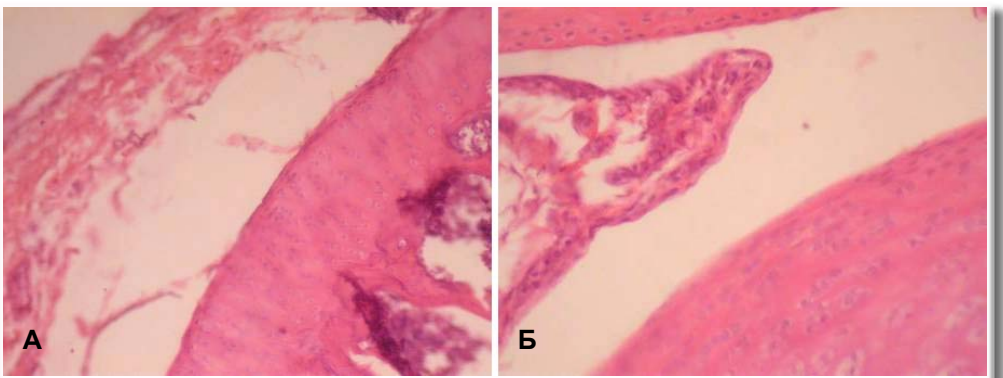


Рис. 10. Морфоструктура колінного суглоба щурів з КІА під впливом ДН станом на 28 добу експерименту. А. Незмінені синовіальна оболонка і суглобовий хрящ. Б. Помірна крайова гіперплазія синовіоцитів. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 150$.

Окрім того, під впливом ДН у третини тварин з КІА відмічені залишкові запальні явища в периартикулярних тканинах: незначна проліферація сполучної тканини серед прилеглих м'язових волокон (рис. 12а) і мікроциркуляторні порушення (розширені судини, лейкоцити в просвітах і периваскулярно) в області, що розділяє паросткову зону хряща і субхондральну кістку (рис. 12б).

Висновки

1. Під впливом імунізації щурів за допомогою колагену II типу та повного ад'юванту

Фрейнда у суглобах тварин виникають виражені морфологічні ознаки аутоімунного артриту: на початковому етапі патологічний процес протікав у вигляді гострого синовіту, інтенсивної проліферації та формування панусу, деструктивно-дистрофічні явища хрящової тканини виявлялися у вигляді з'їденості поверхневих зон; до 28 дня експерименту гострий синовіт змінювався продуктивним, деструктивно-дистрофічне ураження хряща посилювалось, аж до повної втрати структури і заміщення уражених ділянок грануляційною тканиною.

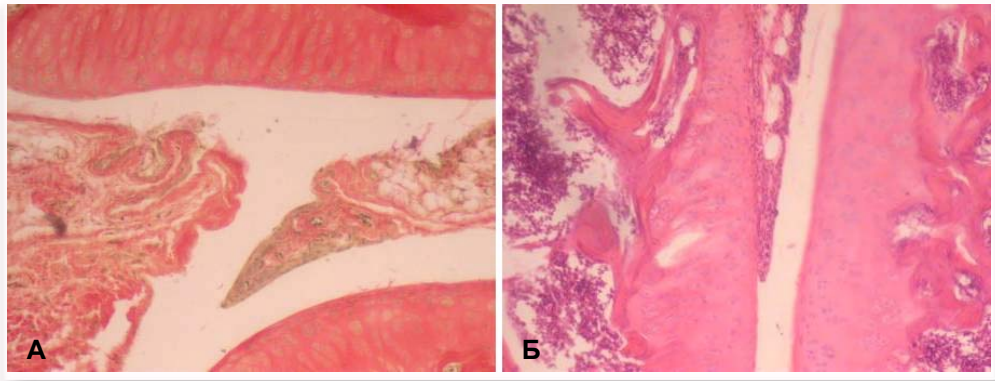


Рис. 11. Морфоструктура колінного суглоба щурів з КІА під впливом ДН станом на 28 добу експерименту. А. Сино-
вій без ознак гіперплазії. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. $\times 150$. Б. Вузький панус, що наповзає на бічну по-
верхню хряща. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 150$.

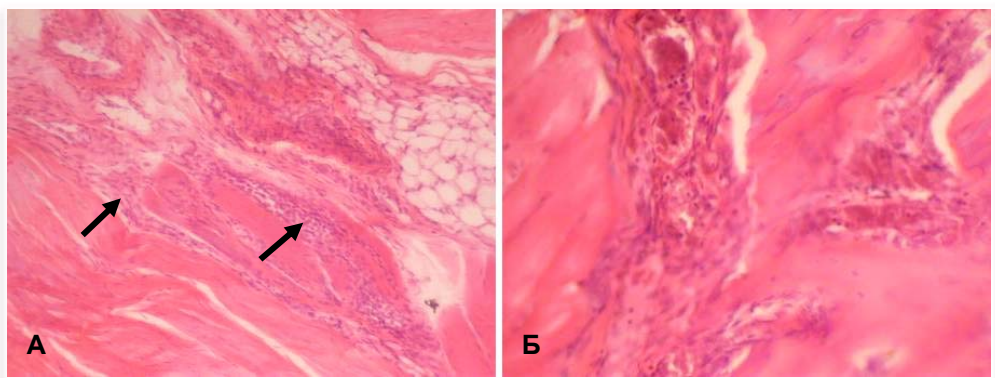


Рис. 12. Морфоструктура колінного суглоба щурів з КІА під впливом ДН станом на 28 добу експерименту. А. Про-
ліферація сполучної тканини серед м'язових волокон (стрілки). Б. Судинні порушення в периартикулярних тканинах.
Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 150$.

2. Диклор, як і диклофенак натрію, чинив виражений нормалізуючий вплив на морфологічні зміни у суглобах щурів з колагеніндукованим артритом, деструкція хряща була відсутня, гіперплазія покривних тканин виражена слабо; під впливом Диклору спостерігались залишкові явища в синовіальних оболонках, під впливом дилофенака натрію – в периартикулярних тканинах.

3. Застосування кверцетину з лікувальною

метою меншою мірою сприяло уповільненню деструкції суглобового хряща та зниженню виразності запальних процесів в синовіальній оболонці й периартикулярних тканинах; спостерігався достатньо високий рівень гіперпластичних процесів в синовії і формування панусу.

Перспективи подальших розробок

Перспективним є вивчення протизапальних і хондропротекторних властивостей Диклору на інших моделях експериментального запалення.

Літературні джерела References

1. Kovalenko VM, Bortkevych OP, Protsenko GO. [NSAIDs: role and place in modern rheumatological practice on the principles of evidence-based medicine]. Ukrainian rheumatological journal. 2006;1(23):17-29. Ukrainian.

2. Gardi C, Bauerova K, Stringa B. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. Arch Biochem Biophys. 2015;583:150-7. doi:10.1016/j.abb.2015.08.008.

3. Ben Abdallah F, Zribi N, Ammar-Keskes L. Antioxidative potential of Quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro. Andrologia. 2011;43:261-5. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01063.x

4. Mironov AN, Bunatyan ND. [Preclinical trials manual. Part 1]. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. Russian.

5. Stefanov O, Buhtiarova T, Kovalenko V. [Directive ST-H MOZU 42-6.0:2008. Medicines.

Good laboratory practice]. Kyiv: Morion; 2009. 37-68 p. Ukrainian.

6. Remmers EF, Joe B, Griffiths MM, Dobbins DE, Dracheva SV, Hashiramoto A, Furuya T, Salstrom JL, Wang J, Gulko PS, Cannon GW, Wilder RL. Modulation of multiple experimental arthritis models by collagen-induced arthritis quantitative trait loci isolated in congenic rat lines. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;46(8):2225-34.

7. Ulumbekova EG, Chelysheva YuA. [Histology: Textbook]. 2nd ed., rev. and enl. Moscow: GEOTAR-MED; 2002. 672 p. Russian

8. Sarkisova DS, Perova YuL. [Microscopic technique: manual]. Moscow: Medicine; 1996. 544 p. Russian.

9. Rebrova OYu. [Statistical analysis of medical data. Software STATISTICA application]. 3rd ed. Moscow: MediaSphera; 2006. 312 p. Russian.

Попов А.С., Зупанец И.А., Шебеко С.К. Морфологическое исследование влияния препарата "Диклокор" на ход коллаген-индуцированного артрита у крыс.

Реферат. Целью работы было изучить влияние Диклокора на ход коллаген-индуцированного артрита у крыс в сравнении с диклофенаком натрия и кверцетином. Аутоиммунный артрит воспроизводили путем подкожного введения коллагена II типа ("Sigma-Aldrich», США). Морфологические исследования проводили с помощью стандартных методов световой микроскопии. Результаты и выводы: Диклокор и диклофенак натрия оказывают выраженное нормализующее влияние на морфологические изменения в суставах крыс, в то время как кверцетин проявляет меньшую активность.

Ключевые слова: Диклокор, диклофенак, кверцетин, коллаген-индуцированный артрит, морфология.