

О ВЛИЯНИИ ПРЕПАРАТА “ДИКЛОКОР” НА ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА В СУСТАВНОМ ХРЯЩЕ КРЫС С ОСТЕОАРТРОЗОМ

И. А. Зупанец¹, С. К. Шебеко¹, А. С. Шаламай², А. С. Попов¹

Представлены результаты иммуногистохимического исследования влияния диклора на процессы апоптоза хондроцитов в сравнении с его активными компонентами — диклофенк-натрием и кверцетином на фоне развития остеоартроза у крыс. Для оценки интенсивности апоптоза в суставном хряще использовали TUNEL-метод. Показано, что повторное введение дексаметазона вызывает проапоптотический эффект в хрящевой ткани животных. При этом под влиянием диклора отмечалось уменьшение количества TUNEL-позитивных хондроцитов. Диклор по данному показателю превосходит эффект диклофенак-натрия и незначительно — кверцетин. Таким образом, диклор оказывает хондропротекторное действие в патологически измененном суставном хряще, что позволяет рассматривать его как перспективное противовоспалительное средство для лечения пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями суставов.

Ключевые слова: диклор; диклофенак-натрий; кверцетин; апоптоз хондроцитов; экспериментальный остеоартроз.

ВВЕДЕНИЕ

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) являются одной из широко применяемых групп лекарственных средств в клинической практике. Однако их применение сопряжено с высоким риском развития побочных эффектов, которые в целом встречаются в 25 % случаев, а в 5 % — составляют серьезную угрозу жизни [2].

Одной из наиболее известных проблем использования НПВП у больных ревматологического профиля является противовоспалительная терапия пациентов с остеоартрозом (ОА), что связано с негативным влиянием ряда препаратов данной группы на метаболизм суставного хряща [8].

При этом в хрящевой ткани усиливаются процессы апоптоза, который является основным механизмом гибели хондроцитов при дегенеративно-дистрофической модификации хряща [9, 10].

Одним из вариантов решения изложенной проблемы является изучение комбинаций НПВП с веществами, уменьшающими их хондротоксическое действие благодаря наличию антиапоптотических, антиоксидантных и антигипоксических свойств. В связи с этим представляет интерес препарат диклор производства ПАТ НПЦ “Борщаговский ХФЗ” (Украина), содержащий 25 мг диклофенак-натрия и 40 мг кверцетина.

Целью исследования стало изучение антиапоптотической активности диклора в условиях развития системного стероидного артроза у крыс в сравнении с его компонентами — диклофенак-натрием и кверцетином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния диклора на процессы апоптоза в хрящевой ткани проведено на 50 крысах обоего пола массой 250–300 г, которые были разделены на 5 групп по 10 животных в каждой: 1 — интактный контроль, 2 — контрольная патология, 3 — крысы с ОА, получавшие диклор в дозе 17,8 мг/кг, 4 — крысы с ОА, получавшие кверцетин в дозе 11 мг/кг в виде препарата кверцетин (гранулы, ПАТ НПЦ “Борщаговский ХФЗ”, Украина), 5 — крысы, получавшие диклофенак-натрий в дозе 6,8 мг/кг (вольтарен, таблетки, “Novartis Pharma”, Швейцария).

Исследование осуществляли на модели кортикостероидной дистрофии соединительной ткани [5] у крыс в нашей модификации, которую воспроизводили путем 3-кратного внутримышечного введения дексаметазона фосфата (“KRKA”, Словения) в дозе 7 мг/кг с интервалом в 1 неделю [4, 7]. При такой схеме воспроизведения возникновения первых признаков патологического процесса ожидается уже через 1 неделю после последней инъекции дексаметазона.

Начиная с 28 дня исследования и на протяжении 4 недель, животные ежедневно получали соответствующие препараты, которые вводили внутривенно в виде экстенпоральных суспензий.

На 56 сут исследования животных выводили из эксперимента и проводили забор коленных суставов для иммуногистохимических исследований. Суставы крыс подвергали немедленной фиксации в 10 % нейтральном забуференном формалине, далее без промывки материал декальцинировали в течение 3 недель в 10 % растворе ЭДТА натрия, изготовленном с использованием фиксатора при pH = 7,4 [3]. После этого проводили дегидратацию образцов в спиртах возрастающей концентрации и заливку в парафин. Далее изготавли-

¹ Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, 61057, Украина, Харьков, ул. Пушкинская, 27.

² ПАО НПЦ “Борщаговский ХФЗ”, 03134, Украина, Киев, ул. Мира, 17.

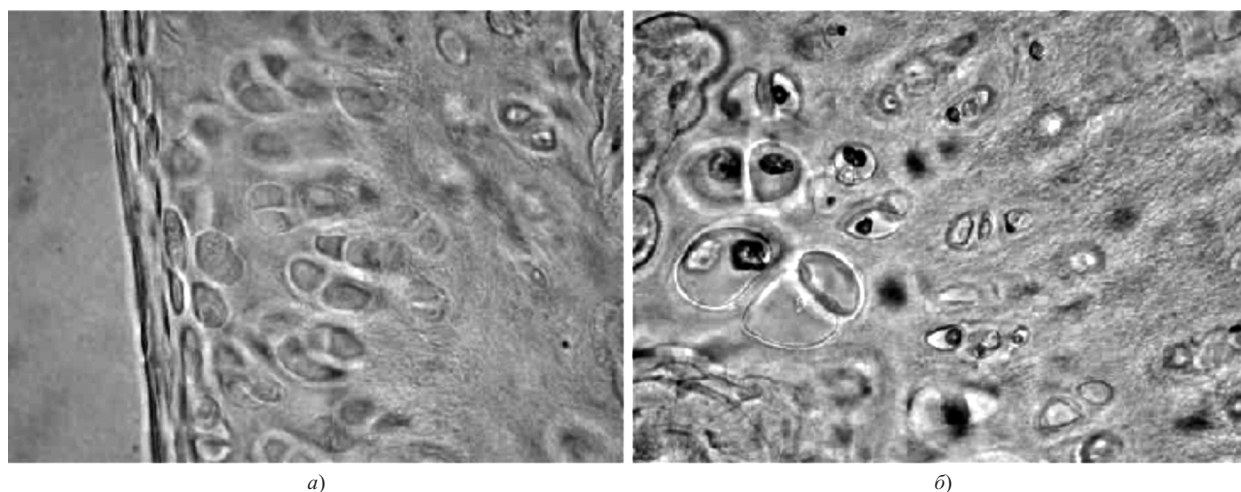


Рис. 1. Суставной хрящ коленного сустава: а) интактных крыс. Отсутствие апоптотических меток. TUNEL-реакция. $\times 250$; б) крыс с ССА. Высокая плотность клеток с апоптотическими метками. TUNEL-реакция. $\times 250$.

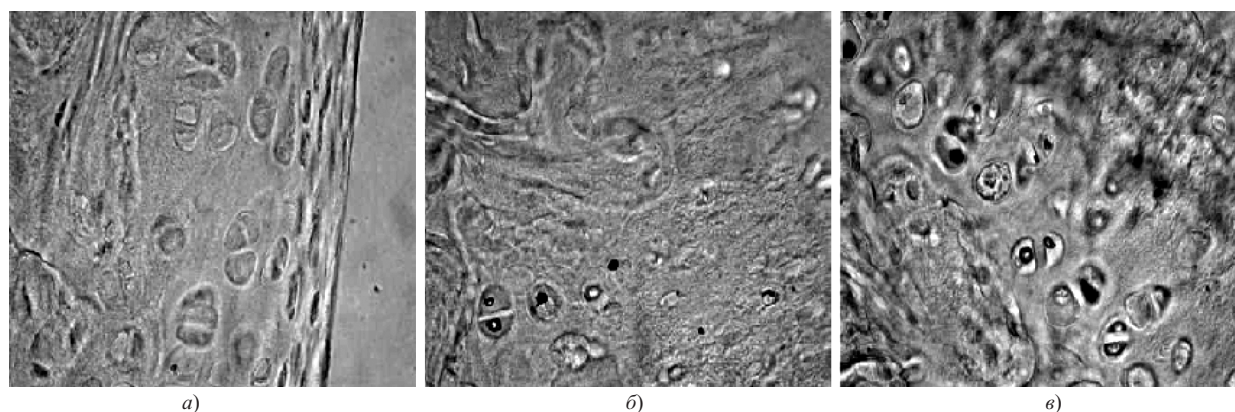


Рис. 2. Суставной хрящ коленного сустава крыс с ОА под воздействием; а) диклокора. Нормальная цитоархитектоника хряща. Единичные хондроциты с апоптотическими метками в ранней стадии процесса. TUNEL-реакция. $\times 250$; б) кверцетина. Единичные TUNEL-позитивные клетки в поле зрения. TUNEL-реакция. $\times 250$; в) вольтарена. Группы апоптотических хондроцитов. TUNEL-реакция. $\times 250$.

вали срезы, которые монтировали на предметные стекла с помощью раствора поли-L-лизина (“Sigma”, США). Срезы депарафинировали и подвергали специфическому окрашиванию с помощью набора “In Situ Cell Death detection Kit, AP” (кат. № 11 684 809 910) (“Roche”, Германия) для выявления апоптоза. Метод регистрации эффекта TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling) основан на мечении обрывков ДНК флуоресцеин-дезоксигуанидином с последующим определением включений флуоресцеина антителами и их визуализацией, что является наиболее точным и специфичным методом для выявления апоптоза [7]. Регистрацию апоптотического мечения осуществляли визуально с помощью светового микроскопа. Цифровые результаты визуализации апоптоза клеток подвергали статистическому анализу с определением достоверности полученных результатов [1].

Все исследования проводили в соответствии с директивой Совета ЕС 86/609 ЕЕС от 24.11.1986 г. о защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования готовили микропрепараты с заведомо отсутствующим и заведомо присутствующим апоптотическим мечением клеток (негативный и позитивный контроль, соответственно). Клетки, имеющие темное окрашивание по периметру ядра или темные включения в цитоплазме, регистрировали как TUNEL-позитивные, т.е. находящиеся в состоянии апоптоза. В негативном контроле подобные клетки отсутствовали.

При сопоставлении уровней апоптоза в группах интактного контроля и контрольной патологии представляется несомненным тот факт, что клеточная гибель — важный компонент, который характеризует развитие

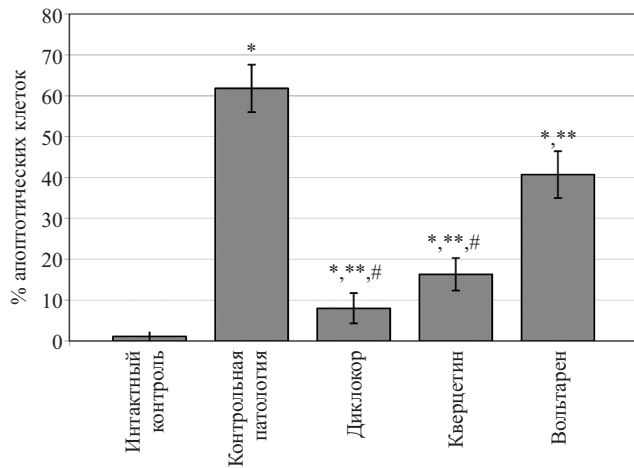


Рис. 3. Процентное количество апоптотических клеток в тканях суставного хряща под влиянием исследуемых препаратов:

* достоверно по сравнению с интактными животными;
 ** достоверно по сравнению с группой контрольной патологии;
 # достоверно по сравнению с животными, получавшими вольгарен.

ОА. Если у интактных крыс уровень апоптоза суставного хряща находился в пределах 1 % (рис. 1, а), то после воздействия дексаметазона от 55 до 70 % клеток находились на той или иной стадии апоптотической гибели (рис. 1, б). Хотя TUNEL-позитивные клетки идентифицировались во всех слоях хряща, в промежуточном и глубоком слоях было локализовано подавляющее их большинство. Такие клетки содержали темно-окрашенные ядра, по их периметру находился четко прокрашенный фрагментированный хроматин. У части клеток фрагменты ДНК оказывались в цитоплазме в виде темных включений ядерного хроматина. Часто наблюдались пустые лакуны. Иногда из двух клеток, находившихся в одной лакуне, одна подвергалась апоптозу, а другая была в пределах нормы (рис. 1, б). Таким образом, введение дексаметазона индуцирует вступление клеток суставного хряща в процесс апоптоза.

Под действием диклокора наблюдалось уменьшение числа TUNEL-позитивных клеток до 11,8 % (рис. 2, а), что почти в 5 раз меньше показателя группы контрольной патологии. Апоптотические хондроциты встречались, в основном, в промежуточном и глубоком слоях. Пустые лакуны встречались крайне редко. Микропрепараты суставного хряща леченных крыс были приближены к интактным. Случаи апоптоза хондроцитов встречались редко и характеризовались полиморфизмом. Значительная часть апоптотических хондроцитов находилась на начальной стадии процесса, что визуально характеризовалось окраской периметра ядра. Лишь в некоторых клетках наблюдалось завершение процесса апоптоза, а именно, полное сжатие ДНК ядра в плотную пикнотическую массу интенсивно черного цвета. Плотность клеток оставалась высокой, на уровне интактных животных. На отдельных микропрепаратах отмечены незначительные бес-

клеточные поля. Количество изогенных групп клеток мало отличалось от интактной группы. Хондроциты были крупными, хорошо развитыми.

На фоне терапии кверцетином (рис. 2, б) число клеток, вступивших в апоптоз, достигало 16,3 %. Это не только хондроциты глубоких и промежуточных зон, но иногда и клетки поверхностного слоя. Как правило, в поле зрения определялось не более 2 – 3 TUNEL-позитивных клеток, однако в отдельных случаях их количество достигало 24 %.

Под действием вольгарена интенсивность процессов апоптоза в суставном хряще находилась на уровне контрольной патологии без статистических отличий (рис. 2, в). Более 40 % клеток были определены как TUNEL-позитивные. В препаратах встречались группы апоптотических хондроцитов. Ядра таких клеток были четко прокрашены по периметру, варьировали по размерам и форме. Некоторые ядра были пикнотичны и разрушены, определялись отдельными фрагментами. Наблюдалось много пустых лакун, клетки которых, вероятно, погибли ранее.

Результаты морфометрического анализа состояния суставного хряща крыс по итогам TUNEL-реакции под влиянием исследуемых препаратов представлены на рис. 3.

Представленные данные свидетельствуют о том, что при сравнении влияния диклокора и вольгарена на процессы апоптоза в суставном хряще крыс с ОА разница между средним количеством апоптотических хондроцитов является статистически значимой, а именно: процент апоптотических клеток в группе животных, получавших диклокор, достоверно меньше, чем в группе, получавшей вольгарен. Процент апоптотических клеток под влиянием кверцетина меньше, чем в группе с вольгареном, а сравнение влияния на данный показатель диклокора и кверцетина показало статистически незначимую разницу.

Таким образом, наиболее выраженное влияние на предотвращение или замедление апоптотической гибели хондроцитов в условиях экспериментального ОА отмечено для диклокора по сравнению с группами контрольной патологии и животными, получавшими вольгарен.

ВЫВОДЫ

1. На фоне развития остеоартроза наибольшую антиапоптотическую активность в хрящевой ткани проявил диклокор, что заключалось в уменьшении количества TUNEL-позитивных клеток по сравнению с контрольной патологией и вольгареном.

2. Совместное применение диклофенак-натрия с кверцетином в составе диклокора способствует модификации влияния НПВП на процессы метаболизма суставного хряща, что в условиях данного эксперимента отражалось предотвращением вступления хондроцитов в апоптоз.

3. По результатам исследования диклокор может быть классифицирован как средство с хондропротекторной и антиапоптотической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. И. Левченко, Ю. М. Новожитская, В. В. Сахнюк и др., *Биохимические исследования больных: Методические рекомендации для врачей химико-токсикологических отделов государственных лабораторий ветеринарной медицины Украины*, Киев (2004).
2. В. М. Коваленко, О. П. Борткевич, Г. О. Проценко, *Украин. ревматол. журн.*, № 1, 23, 17 – 29 (2006).
3. Е. А. Зупанец, В. Ф. Усенко, С. К. Шебеко и др., *Информац. лист*, № 191, Киев (2010).
4. Е. А. Зупанец, С. К. Шебеко, И. А. Отришко, *Лекарства Украины плюс*, 3(12), 47 – 50 (2010).
5. И. А. Зупанец, Н. А. Корж, Н. В. Дедух и др., *Методические рекомендации по экспериментальному исследованию и клиническому изучению противоартрозных (хондромодулирующих) лекарственных средств*, Киев (1999).
6. И. А. Зупанец, В. А. Туляков, С. К. Шебеко, *Эксперим. и клин. фармакол.*, 75(4), 34 – 37 (2012).
7. И. В. Вальчук, В. В. Чопяк, С. И. Павлович, О. О. Мойбенко, *Сердце и сосуды*, № 1, 11 – 14 (2006).
8. Н. А. Корж, Н. В. Дедух, И. А. Зупанец, *Остеоартроз: консервативная терапия: Монография*, Золотые страницы, Харьков (2007).
9. Ed. H. J. Rode, Apoptosis, *Cytotoxicity and Cell Proliferation*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (2008).
10. R. C. Taylor, S. P. Cullen, S. J. Martin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, № 9, 231 – 241 (2008).
11. T. Gusdinar, R. Herowati, R. E. Kartasmita, et al., *J. Pharmacol. Toxicol.*, 6, 182 – 188 (2011).

Поступила 26.05.15

Zupanets I. A., Shebeko S. K., Popov A. S.

The study of apoptosis in articular cartilage in rats with osteoarthritis under the influence of the drug “Diklokor”

The article presents the results of immunohistochemical studies of the effect made by the drug “Diklokor” on apoptosis of chondrocytes in rats with experimental osteoarthritis in comparison to its active components — diclofenac sodium and quercetin. In order to evaluate the intensity of apoptosis in the cartilage TUNEL method was used. The study has shown that the repeated administration of dexamethasone has proapoptotic effect in animals’ cartilage. Under the influence of Diklokor there was a significant decrease in the number of TUNEL-positive chondrocytes. In this aspect Diklokor was found to be significantly superior to diclofenac and slightly exceeded quercetin. Thus, Diklokor obtains chondroprotective action, which allows considering it as a promising anti-inflammatory agent for treatment of patients with degenerative diseases of joints.