

УДК 615.015.23:615.21/26:577.175.14

К. Г. ЩОКІНА

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АНТАГОНІСТА РЕЦЕПТОРІВ ІЛ-1 (АРИЛ-1) НА ПРОЦЕСИ АПОПТОЗУ НА МОДЕЛІ СТЕРЕОЇДНОГО ОСТЕОАРТРИТУ У ЩУРІВ

У статті наведено результати вивчення впливу оригінального рекомбінатного антагоніста рецепторів ІЛ-1 (АРИЛ-1) на процеси апоптозу на моделі системного стероїдного остеоартриту (ССО) у щурів. Підтверджено, що моделювання ССО демонструє роль апоптозу хондроцитів у патогенезі дегенеративно-дистрофічного ураження суглобного хряща. Уведення дексаметазону срямовує баланс синтетичних процесів у бік катаболізму, сприяє дегенерації хондроцитів, індукує їх інтенсивний апоптоз та може вважатися віддзеркаленням патологічних змін суглобного хряща при старінні організму. Застосування АРИЛ-1 виявляє позитивний вплив на процеси апоптозу в умовах ССО, що доводить важливу роль антиапоптотичної складової в механізмі впливу АРИЛ-1 на дистрофічно змінену хрящову тканину. В умовах розвитку модельної патології даний препарат інгібує проапоптотичний ефект дексаметазону та не поступається за рівнем антиапоптотичної активності референс-препарату ГА. Аналіз отриманих даних на тлі експериментального остеоартриту дозволяє зробити висновок про високий хондропротекторний потенціал АРИЛ-1.

Ключові слова: АРИЛ-1, остеоартрит, апоптоз, хондропротекторна дія.

ВСТУП

Остеоартрит є одним з найбільш розповсюджених захворювань, являє собою медичну та соціально-економічну проблему та посідає одне з перших місць серед причин тривалої непрацездатності населення в світі. Захворюваність на остеоартрит невинно прогресує [5, 8]. За даними ВООЗ, на остеоартрит страждають 6,4-12 % населення планети. Загальна кількість хворих на остеоартрит в Україні перевищує 1 203 000 осіб. У віці понад 60 років різні прояви остеоартриту спостерігаються практично у кожній людині, тому пошук нових хондропротекторів є актуальним завданням фармакології та медицини [4, 10].

Дедалі більше привертають увагу цитокінові механізми розвитку остеоартриту. Відомо, що прозапальний інтерлейкін-1 (ІЛ-1) у клітинах кісткової та хрящової тканини стимулює продукцію хондроцитами протеаз, збільшує продукцію простагландину E_2 , посилює проліферацію синовіальних фібробластів і хондроцитів. У м'язовій тканині під впливом ІЛ-1 відбувається протеоліз м'язів, стимуляція синтезу простагландину E_2 . Під впливом ІЛ-1 клітини

сполучної тканини збільшують синтез одночасно колагену та колагенази, а також нейтральної протеази і металопротеїнази [14]. За рахунок стимуляції проліферації та функціональної активності як остеобластів, так і остеокластів ІЛ-1 може, з одного боку, посилювати процеси утворення сполучної та кісткової тканини, а з іншого – сприяти резорбції хряща та кістки [15]. Імовірно, ІЛ-1 здатний також втручатися в обмін глікозаміногліканів [14, 16]. Тобто можна припустити, що антагоніст рецепторів ІЛ-1 має володіти хондропротекторними властивостями.

Мета роботи – визначення впливу оригінального рекомбінатного антагоніста рецепторів ІЛ-1 (АРИЛ-1), який отримано в НДІ особливо чистих біопрепаратів (Санкт-Петербург, Росія), на процеси апоптозу в умовах модельного системного стероїдного остеоартриту (ССО) у щурів, що дозволить експериментально обґрунтувати доцільність його застосування у хворих з дегенеративно-дистрофічними захворюваннями суглобів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

З метою поглибленого вивчення хондропротекторної активності АРИЛ-1 було проведено вивчення його впливу на процеси апоптозу в су-

глобному хрящі колінних суглобів щурів на тлі розвитку ССО за станом на 56-ту добу експерименту. Дослідження проводили на 50 щурах масою 250-300 г. За препарат порівняння обрано еталонний хондропротектор глюкозаміну гідрохлорид (ГА) [3]. АРІЛ-1 вводили підшкірно в умовно-ефективній дозі за протизапальною активністю 3 мг/кг, ГА перорально – в дозі 50 мг/кг [3].

Модель ССО [12] відтворювали у модифікації [6] шляхом внутрішньом'язового трикратного введення дексаметазону у дозі 7 мг/кг з інтервалом в один тиждень. Починаючи з 28 дня дослідження і на протязі 4 тижнів вводили досліджувані препарати відповідним шляхом 1 раз на добу. На 56 добу експерименту тварин виводили з експерименту та відбирали біоматеріал для гістохімічних досліджень.

Дослідження ультраструктури суглобового хряща проводили за допомогою стандартних методів електронної мікроскопії [1, 2]. Ідентифікацію апоптозних клітин у тканинах суглобового хряща проводили імуногістохімічно на напівтонких парафінових зрізах методом TUNEL-реакції (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling) за допомогою наборів «In Situ Cell Death Detection Kit, AP» виробництва «Roche Diagnostics» (Німеччина) [2, 7]. Мікропрепарати вивчали за допомогою електронного мікроскопа «EM-125» (Сумське ВО «Електрон», Україна) при збільшенні 8 000-20 000 крат, при цьому проводили морфометричну оцінку специфічно маркованих за допомогою TUNEL-методу апоптозних клітин у хрящовій тканині [7]. Для фотографування мікропрепаратів використовували висококонтрастну фототехнічну плівку «Maco EM Films» («Maco Photo Products», Німеччина).

Для статистичної обробки результатів, наведених у вигляді середнє ± стандартна помилка середнього, використовували t-критерій Ст'юдента [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У ході дослідження проводили кількісно узагальнену морфометричну оцінку стану суглобового хряща щурів за результатами TUNEL-реакції під дією досліджуваних препаратів. При цьому визначали процент апоптотично змінених клітин при вивченні мікропрепаратів у полі зору світлового мікроскопу зі збільшенням 250 крат. Результати наведено в таблиці.

В процесі дослідження були виготовлені мікропрепарати із відсутньою та наявною апоптотичною маркіруванням клітин (негативний і позитивний контроль – рис. 1а та 1б відповідно). Клітини, які мають темне забарвлення по периметру ядра (відтінки від базофільного до ін-

тенсивно чорного) та містять ядерні фрагменти в цитоплазмі або апоптотичні тільця в лакуні, реєструвались як позитивні (рис. 1б). У негативному контролі подібні клітини відсутні (рис. 1а).

Таблиця

МОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУГЛОБНОГО ХРЯЩА ЩУРІВ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ TUNEL-РЕАКЦІЇ ПІД ВПЛИВОМ АРІЛ-1, 3 МГ/КГ

| Група тварин | TUNEL-позитивні (апоптотично змінені) клітини, % |
|----------------------------------|--|
| Інтактний контроль (n=10) | 1,6±0,6 |
| Контрольна патологія (n=10) | 42,3±2,1* |
| АРІЛ-1, 3 мг/кг (n=10) | 15,9±1,9*# |
| Глюкозаміну г/х, 50 мг/кг (n=10) | 12,1±2,0*# |

Примітки: статистично значущі відмінності (p<0,05): * з групою інтактних тварин; # з групою контрольної патології.

При аналізі отриманих результатів видно, що рівень апоптозу був більш значущим для артрозного хряща, ніж для нормального. Апоптотичні клітини траплялися нечасто в препаратах інтактних тварин: лише поодинокі екземпляри були визначені в декількох полях зору.

Основна частина хондроцитів відрізнялась позиційною специфічністю та класичною цитоархитектонікою (рис. 2а, 2б). Клітини на ранніх стадіях апоптозу присутні в поодиноких кількостях і характеризувались забарвленням по периметру ядра (рис. 2б). У середньому по групі рівень апоптозу становив 1,6 % (табл.). Апоптотичні клітини розташовувалися виключно в глибоких зонах суглобового хряща.

Після впливу дексаметазону від 30 до 60 % клітин знаходились на тій або іншій стадії апоптотичної загибелі (рис. 3а, 3б).

TUNEL-позитивні клітини виявлялись в усіх шарах хряща в кожному мікропрепараті, в кожному полі зору. Особливо густо вони були розташовані в проміжній і поверхневій зонах (якщо ці зони були збережені), чого не спостерігалось в морфологічно нормальному хрящі (рис. 3а). При цьому в глибокій зоні хондроцити були більш життєздатні порівняно з іншими, що принципово відрізняє їх від клітин інтактною групи (рис. 3б). Більшість хондроцитів містили темнозабарвлені ядра, по периметру яких чітко пробарвлювався фрагментований хроматин. У частині клітин фрагменти ДНК визначались у цитоплазмі у вигляді темних грудок ядерного матеріалу. На окремих ділянках виявилися

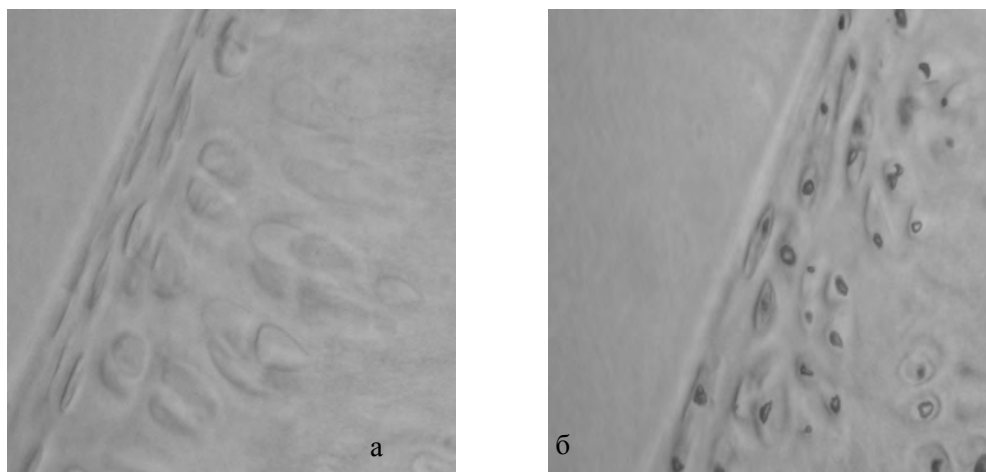


Рис. 1. а – негативний контроль. Відсутність апоптотичної маркування клітин. $\times 400$; б – позитивний контроль. Апоптотична маркування клітин. TUNEL-реакція. $\times 250$

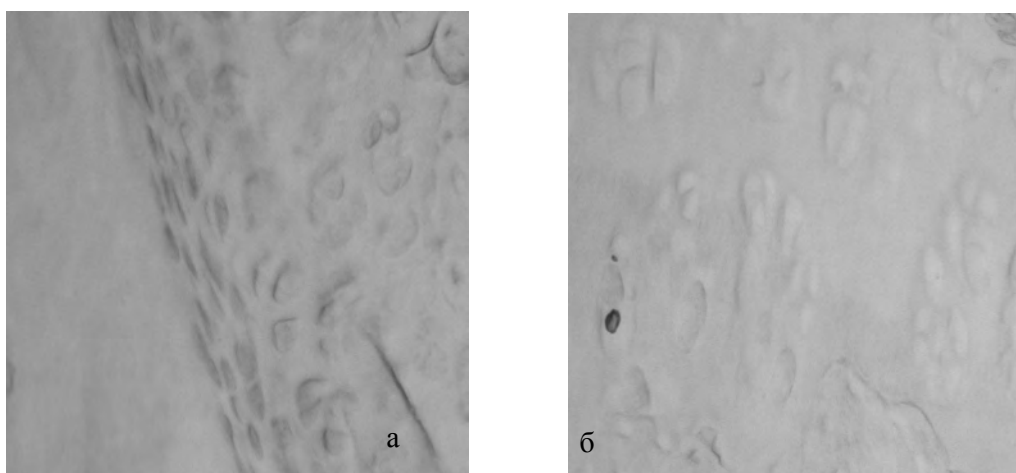


Рис. 2. Суглобний хрящ колінного суглоба інтактних тварин: а – відсутність апоптотичних міток. TUNEL-реакція. $\times 250$; б – проміжна зона, одинична апоптотична клітина. TUNEL-реакція. $\times 400$

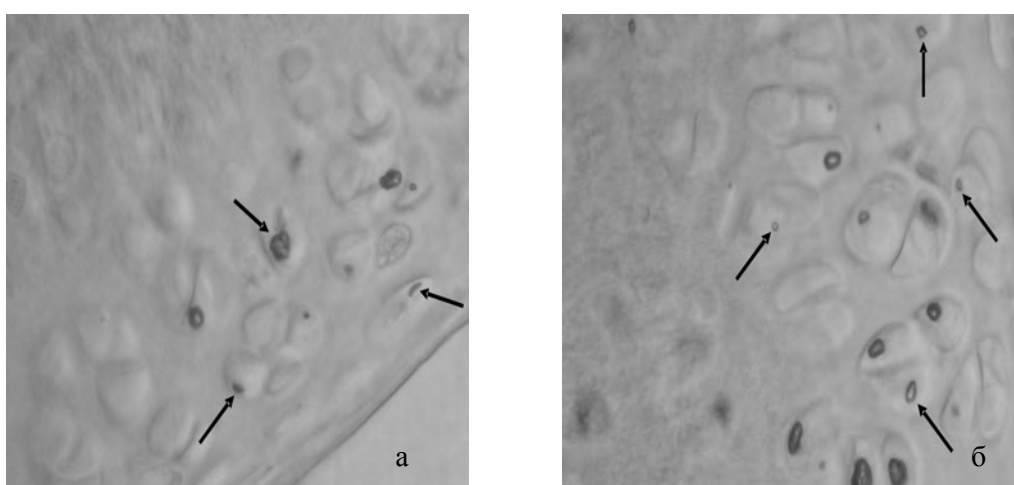


Рис. 3. Суглобний хрящ колінного суглоба щурів із ССО: а – висока щільність клітин з апоптотичними мітками в поверхневому та проміжному шарах (стрілки); б – глибока зона, висока щільність TUNEL-позитивних клітин на початкових стадіях апоптозу (стрілки). TUNEL-реакція. $\times 400$.

групи хондроцитів у стані апоптозу (рис. 3а). При морфометричному аналізі спостерігалась структурна гетерогенність клітин хряща. Часто зустрічалися порожні лакуни, клітини яких, вочевидь, загинули ще раніше. Іноді з двох клітин, які знаходяться в одній лакуні, одна перебувала в стані апоптозу, а інша залишалася в межах норми. Незважаючи на відсутність специфічного забарвлення ядерними та цитоплазматичними барвниками, в багатьох мікропрепаратах спостерігались характерні для ССО зміни морфологічної картини: нерівність поверхні або повна відсутність поверхневого шару хряща, порушення зональності розташування клітин, наявність безклітинних ділянок, поява ізогенних груп тощо [9, 13] (рис. 3а, 3б). В середньому по групі рівень апоптотично змінених клітин досягав 42,3 % (табл.), що перевищує показники групи інтактного контролю в 26 разів.

Таким чином, моделювання ССО яскраво демонструє роль апоптозу хондроцитів в патогенезі дегенеративно-дистрофічного ураження суглобного хряща. Введення дексаметазону срямовує баланс синтетичних процесів у бік катаболізму, сприяє дегенерації хондроцитів, індукує їх інтенсивний апоптоз та може вважатися віддзеркаленням патологічних змін суглобного хряща при старінні організму.

При використанні АРІЛ-1 у дозі 3 мг/кг (рис. 4а, 4б) кількість TUNEL-позитивних клітин, які містять чітко забарвлені ядра та цитоплазматичні мітки, знижувалось до 15,9 %, що в 2,7 разу менше, ніж у тварин групи контрольної патології (табл.). В ряді мікропрепаратів дані клітини спостерігались в усіх шарах суглобного хряща,

а в деяких – тільки в проміжному. В полі зору мікроскопу, як правило, знаходилося від 4 до 7 апоптотичних клітин.

Більшість випадків апоптозу характеризувались поліморфізмом. Значна частина TUNEL-позитивних клітин знаходилась на початковій стадії процесу, що візуалізувалося забарвленням по периметру ядра (рис. 4а). В багатьох випадках апоптотичні мітки були виражені вкрай слабо, що свідчить про низький ступінь фрагментації ядерного матеріалу. Лише поодинокі апоптотичні клітини були на стадії завершення процесу, що характеризувалось повним сдавненням ДНК ядра в щільну пікнотичну грудку з інтенсивним чорним забарвленням.

При цьому структура тканини в мікропрепаратах характеризувалась слабо вираженими патологічними змінами. В багатьох зразках щільність клітин залишалась високою, зональність їх розташування відповідала нормі (рис. 4б). В окремих випадках були визначені незначні безклітинні поля. Кількість ізогенних груп клітин і їх кількість слабо відрізнялись від таких в інтактній групі, але в той самий час в них спостерігались явища апоптозу.

Лікування тварин ГА в дозі 50 мг/кг призвело до зниження частки апоптотичних хондроцитів до 12,1 %, що в 3,5 разу менше, ніж в групі контрольної патології (табл.). В ході дослідження TUNEL-позитивні клітини виявлялись не тільки в глибоких і проміжних зонах (рис. 5а), але й в поверхневому шарі.

У полі зору визначалось не більше ніж 4-5 TUNEL-позитивних клітин, однак в рідких випадках на малоклітинних ділянках до 7-8 клітин

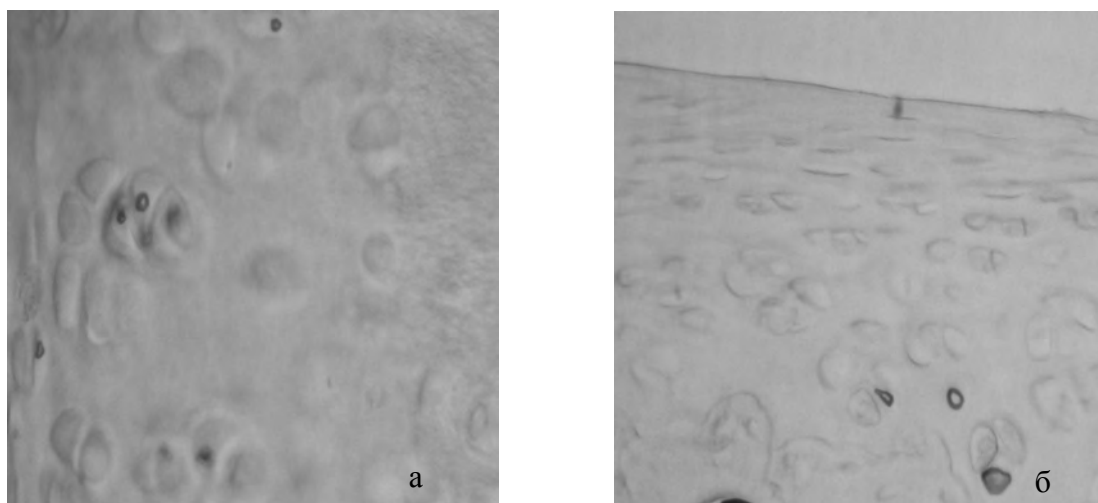


Рис. 4. Суглобний хрящ колінного суглоба щурів із ССО під впливом АРІЛ-1, 3 мг/кг: а – ізогенні групи хондроцитів у стані апоптозу; б – нормальна цитоархитектоніка та позиційна специфічність хондроцитів. TUNEL-позитивні клітини в глибоких шарах хряща TUNEL-реакція. $\times 250$

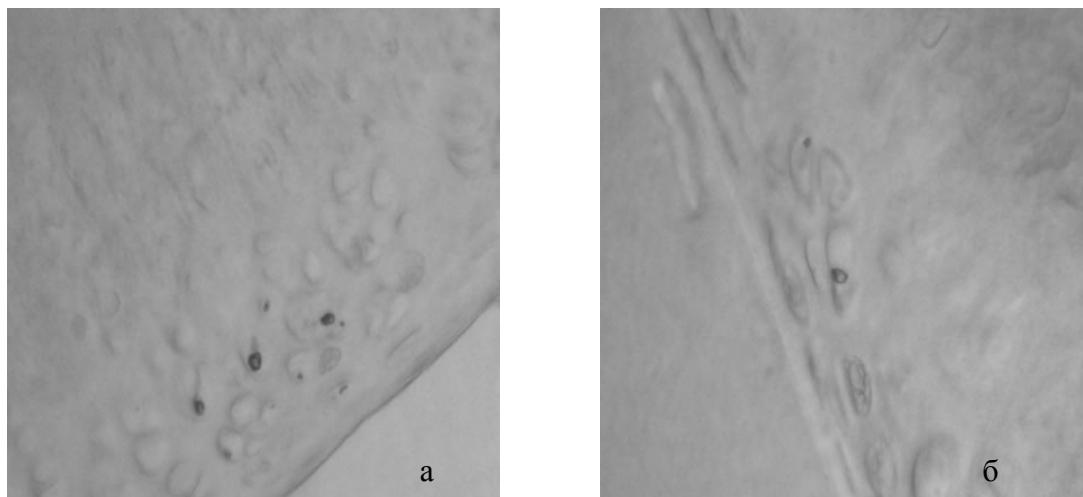


Рис. 5. Суглобний хрящ колінного суглоба щурів із ССО під впливом глюкозаміну гідрохлориду, 50 мг/кг: а – апоптотичні клітини в поверхневій і проміжній зонах. Нормальна цитоархитектоніка тканини. TUNEL-реакція. $\times 250$; б – поверхнева зона. Одиначна TUNEL-позитивна клітина на початковій стадії апоптозу. Порушення зональності розташування хондроцитів. TUNEL-реакція. $\times 400$.

мали ядерні та цитоплазматичні апоптотичні мітки, їх забарвлення варіювало від синього до темно-фіолетового. В деяких мікропрепаратах випадки апоптозу хондроцитів мали одиничний характер і визначались також у поверхневій та проміжній зонах хряща.

Як і в попередніх групах, більшість випадків апоптозу хондроцитів характеризувались поліморфізмом. Близько половини виявлених апоптотичних клітин знаходилось у початковій стадії процесу, яка візуально характеризується забарвленням периметра ядра. Решта хондроцитів мала ознаки завершення процесу, а саме повне стиснення ДНК ядра в щільну пікнотичну грудку з інтенсивним темним забарвленням. У цитоплазмі таких клітин спостерігались апоптотичні мітки, що свідчить про деструкцію конденсованого ядерного матеріалу.

Цитоархитектоніка мікропрепаратів суглобного хряща щурів, лікованих ГА, була наближена до інтактної. Порожні лакуни виявлялись рідко. Щільність клітин залишалась високою, як у інтактних тварин. В окремих випадках були визначені незначні без- та малоклітинні поля. Кількість ізогенних груп клітин і їх кількість у кожній групі мало відрізнялися від інтактного контролю. У випадках виявлення високого ступеню завершеності апоптозу, що візуально виявлялось у наявності масової пікнотизації цитоплазми хондроцитів, також спостерігалось більш активне утворення ізогенних груп. Таким чином, під впливом ГА гідрохлориду відбувається

са достовірне зменшення інтенсивності процесів апоптозу в суглобному хрящі.

ВИСНОВКИ

Результати проведених досліджень підтвердили вагому роль антиапоптотичної складової у механізмі впливу АРІЛ-1 на дистрофічно змінену хрящову тканину. В умовах розвитку модельної патології даний препарат інгібує проапоптотичний ефект дексаметазону та не поступається за рівнем антиапоптотичної активності референс-препарату ГА. Таким чином, можна зробити висновок, що АРІЛ-1 є перспективним хондропротектором.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гистология, цитология и эмбриология / под ред. Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 2002. – 744 с.
2. Гистология : учебник / под. ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Чельшева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 672 с.
3. Зупанець К. О. Дослідження впливу композиції на основі кверцетину та похідних глюкозаміну на процеси апоптозу хондроцитів в умовах розвитку експериментального остеоартриту / К. О. Зупанець, С. К. Шебеко, І. А. Отришко // Ліки України плюс. – 2010 – № 3 (12). – С. 47-50.
4. Медикаментозное лечение остеоартроза (остеоартрита) коленных и тазобедренных

- суставов / О. М. Лесняк, Д. М. Максимов, А. А. Попов [и др.] // *Concilium-medicum*. – 2005. – № 8. – С. 627-633.
5. Королева С. В. Медикаментозное лечение остеоартроза (обзор литературы) / С. В. Королева, С. Е. Львов, Э. В. Григорьев // *Травматология и ортопедия России*. – 2006. – № 3. – С. 76-81.
 6. Методические рекомендации по экспериментальному исследованию и клиническому изучению противоартрозных (хондромодулирующих) лекарственных средств / И. А. Зупанец, Н.А. Корж, Н.В. Дедух [и др.]. – К., 1999. – 56 с.
 7. Микроскопическая техника : рук. / под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.
 8. Насонова В. А. Проблема остеоартроза в начале XXI века / В. А. Насонова // *Consilium-medicum*. – 2000. – № 6. – С. 244-248.
 9. Некачалов В. В. Патология костей и суставов: Руководство / В. В. Началов. – СПб. : Сотис, 2000. – 288 с.
 10. Остеоартроз: консервативная терапия : монография / Под ред. Н.А. Коржа, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. – Х. : Золотые страницы, 2007. – 424 с.
 11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – 3-е изд. – М. : МедиаСфера, 2006. – 312 с.
 12. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
 13. Modifications of Golgi Complex in Chondrocytes from Osteoarthrotic (OA) Rat Cartilage / J. B. Kouri, L. Rojas, E. Perez [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2002. – Vol. 50, No. 10. – P. 1333-1339.
 14. Open label trial of anakinra in active ankylosing spondylitis over 24 weeks / H. Haibel, M. Rudwaleit, J. Listing [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – Vol. 64, N. 2. – P. 296-298.
 15. Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis / K. Rudolphi, N. Gerwin, N. Verzijl [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2003. – Vol. 11, № 6. – P. 738-746.
 16. Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes / G. Palmer, P.-A. Guerne, F. Mezin [et al.] // *Arthritis Res.* – 2002. – Vol. 4, N. 3. – P. 226-231.

УДК 615.015.23:615.21/26:577.175.14

Е. Г. Шекина

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 НА ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА НА МОДЕЛИ СТЕРОИДНОГО ОСТЕОАРТРИТА У КРЫС

В статье представлены результаты изучения влияния оригинального рекомбинантного антагониста рецепторов ИЛ-1 (АРИЛ-1) на процессы апоптоза на модели системного стероидного остеоартрита (ССО) у крыс. Подтверждено, что моделирование ССО демонстрирует роль апоптоза хондроцитов в патогенезе дегенеративно-дистрофического поражения суставного хряща. Введение дексаметазона направляет баланс синтетических процессов в сторону катаболизма, способствует дегенерации хондроцитов, индуцирует их интенсивный апоптоз и может считаться отражением патологических изменений суставного хряща при старении организма. Применение АРИЛ-1 проявляет позитивное влияние на процессы апоптоза в условиях ССО, что доказывает важную роль антиапоптотической составляющей в механизме влияния АРИЛ-1 на дистрофически измененную хрящевую ткань. В условиях развития модельной патологии данный препарат ингибирует проапоптотический эффект дексаметазона и не уступает по уровню антиапоптотической активности референс-препарату ГА. Анализ полученных данных на фоне экспериментального остеоартрита позволяет сделать вывод про высоком хондропротекторном потенциале АРИЛ-1.

Ключевые слова: АРИЛ-1, остеоартрит, апоптоз, хондропротекторное действие.

UDK 615.015.23:615.21/26:577.175.14

E. G. Shokina

STUDY OF THE INFLUENCE OF REKOMBINANT ANTAGONIST RECEPTORS INTERLEUKIN-1 ON APOPTOSIS ON THE MODEL OF STEROID OSTEOARTHRITIS AT RATS

The article presents the results of the study of influence of the original recombinant receptors of antagonist IL-1 (ARIL-1) on apoptosis on the model of systemic steroid osteoarthritis (SSO) at rats. It is proved that the simulation demonstrates the role of SSO apoptosis of chondrocytes in the pathogenesis of degenerative lesions of the articular cartilage. Dexamethasone directs the balance of synthetic processes toward catabolism, contributes to degeneration of chondrocytes, induces apoptosis in their intensive and can be considered a reflection of pathological changes of articular cartilage during aging body. The use of ARIL-1 exhibits a positive effect on apoptosis in SSO, which proves important component in the mechanism of the anti-apoptotic effect of ARIL-1 on dystrophic changes cartilage. With the development of a model disease the drug inhibits proapoptotic effect of dexamethasone, and not inferior to the level of the anti-apoptotic activity of reference drug glucosamine hydrochloride. The analysis of biochemical and morphological data complex against SSO suggests a high hondroprotective potential of ARIL-1.

Key words: ARIL-1, osteoarthritis, osteoarthritis, hondroprotective action.

Адреса для листування:
61168 м. Харків, вул. Мельникова, 12
Кафедра фармакології НФаУ
Тел. (057) 706-30-69

Надійшла до редакції:
16.05.2013