

Противіброзна дія дипроспану, лонгідази та їх комбінацій при механічному травмуванні міжхребцевих дисків у щурів

²Я.В. Фіщенко, ¹Д.О. Заводовский, ³О.М. Мотузюк, ¹Т.Ю. Матвієнко, ¹Д.М. Ноздренко

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології», Київ; e-mail: ddd@univ.kiev.ua;

²ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ; e-mail: fishchenko@gmail.com;

³Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк.

Досліджено формування фіброзу оболонки спинного мозку дорослих щурів, викликаного методом механічного травмування міжхребцевих дисків з епідуральним введенням суміші препаратів лонгідази та дипроспану. Епідуральне введення гіалуронідази та бетаметазону в складі препаратів дипроспану та лонгідази проявило високий синергічний ефект та антифіброзну активність. Противіброзна дія цих двох лікарських препаратів суттєво перевищувала сумарний ефект порівняно з роздільним використанням. Так, зменшення максимальної товщини фіброзного шару становило 49% що до контрольних значень, а зменшення загальної площі фіброзного утворення – 46%. Виявлено проти-запальну дію комплексу, що підсилює позитивний ефект препарату та дає підстави говорити про перспективу його використання для попередження епідурального фіброзу спинного мозку.

Ключові слова: фіброз; сполучна тканина; дипроспан; лонгідаза.

ВСТУП

Фіброз – надмірне розростання сполучної тканини внаслідок певного активуючого фактора (альтерації), що супроводжується рубцюванням. Це можуть бути травми, опромінення, хірургічне втручання, алергію, інфекції тощо [1]. За нормальних умов на місці травми утворюються елементи сполучної тканини. При цьому мезенхімальні фібробласти мігрують у ділянку пошкодження та утворюють у великих кількостях білки матриксу – колаген та фібронектин. Наявні в цій зоні фібробласти синтезують α -SMA-фактор (фактор росту для α -актоміозину), який потрібен для закриття пошкодженої поверхні [2,3].

До цього часу не існує ефективної профілактики післяопераційного епідурального фіброзу, який може виникати при пошкодженні елементів спинномозкового каналу, що є великою проблемою для сучасної медицини [4]. В деяких випадках, як один з компонентів

регуляції процесу фіброзування, використовують препарат гіалуронідази (лонгідаза) - протеолітичний фермент, та бетаметазону (дипроспан) – синтетичний глюкокортикоїд, та їх комбінацію [5].

Мета нашого дослідження – вивчення впливу гіалуронідази та бетаметазону на темпи та якість розвитку зайвої сполучної тканини під час епідурального фіброзування.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 16 дорослих щурах лінії Вістар масою від 0,2 до 0,3 кг, які були поділені на 4 групи: контрольну (4 тварини) і 3 дослідні (по 4 тварини). При попередній підготовці до експерименту анестезію здійснювали внутрішньочеревним введенням нембуталу (40 мг/кг). Фіброз викликали методом механічного травмування міжхребцевих дисків. В епідуральну порожнину тварин

одразу після хірургічного втручання вводили лонгідазу та дипроспан у концентраціях 1 мл/кг (2-га та 3-тя групи відповідно). Щурам четвертої дослідної групи вводили суміш цих препаратів по 0,5мл/кг. Через 10 діб ініціації фіброзу тварин декапітували з урахуванням рекомендацій міжнародного комітету щодо гуманного поводження з експериментальними тваринами.

Спинний мозок тримали протягом 2 тиж у 10%-му формаліні і впродовж 10 діб у 7%-му. Для приготування зрізів заливали матеріал у парафін-воскову суміш (95 % парафіну і 5 % очищеного воску). Перед цим поміщали його в суміш різних частин абсолютного спирту і ксилолу на 1 год. Потім матеріал переносили послідовно в ортоксилол на 30-40 хв, а згодом в насичений розчин парафіну в ортоксилолі при 37°C на 1 год і в перший чистий парафін до 2 год при 57°C, а потім в другий чистий парафін до 1 год при 57°C. Блоки нарізали проводили на санному мікротомі (МС-2) з товщиною зрізу 10 мкм. Сполучну тканину виявляли за Ван-Гізеном [10].

Фотографували препарати за допомогою цифрової камери SEO на мікроскопі Axioscop "Carl ZEISS", Німеччина. Мікрофотографії, отримані за допомогою світлової мікроскопії, обробляли за допомогою програми ВідеоТест Морфологія 5.0.

Обробляли результати методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Statistica 8.0 ("StatSoft", США). Перевірку вибірок на їхню приналежність до нормально розподілених здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Вілка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували U-критерій Манна-Вітні. Вірогідними вважали відмінності при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що в твердій оболонці спинного мозку швидко збільшувалася кількість сполучнотканинних елементів з подовженням

часу після індукції фіброзу (рис.1). Товщина прошарку сполучної тканини на 10-ту добу після механічного травмування зросла до 330 % порівняно з нормою та на 13 % що

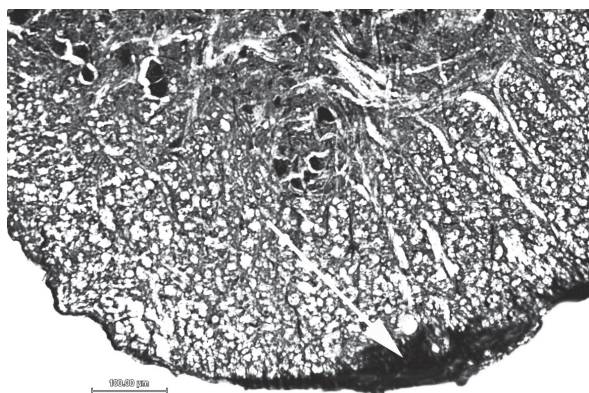
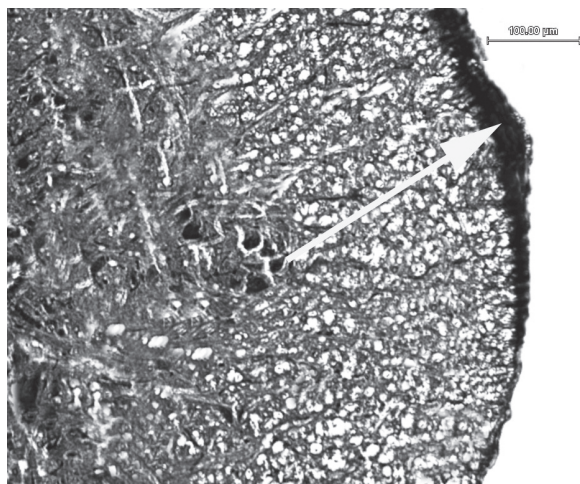
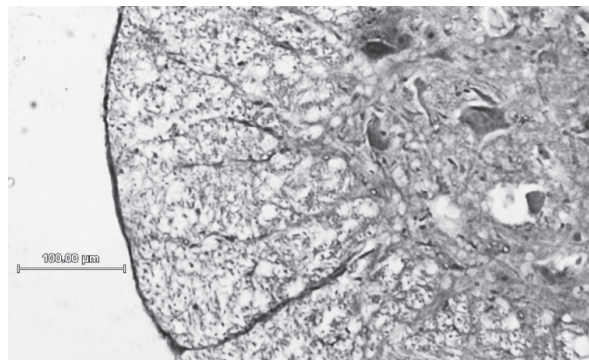


Рис. 1. Поперечний переріз нативного спинного мозку щура (а), через 5 (б) та 10 (в) діб після активації фіброзу (світлова мікроскопія, x100) Стрілками показані місця виникнення фіброзних структур

до значень с 5-ї доби після ініціації фіброзу (рис. 2).

Значно збільшилось і співвідношення кількості сполучної тканини в різні періоди фіброзування. Загальна площа фіброзних утворень між 5-ю та 10-ю добами зросла на 60%. Отже, спостерігалось стрімке зростання прошарку колагенових волокон зі збільшенням часу після виникнення післяопераційного епідурального фіброзу. Ймовірно, що зміни торкнулися внутрішньоклітинних компонентів жорсткості, які представлені цитоскелетом, що сприяло розростанню сполучної тканини з появою рубцевих змін, які виникають, як правило, в результаті хронічного запалення.

Введення дипроспану (1мл/кг) призвело до змін морфофункціонального стану сполучної тканини щурів (рис. 3,4). Кількість сполучної тканини після ініціації фіброзу зменшилася на 27%. Зменшення максимальної товщини фіброзу становило 43% в порівняно з контрольними значеннями (10-та доба після активації фіброзу). Зафіксовано зменшення загальної площі фіброзного утворення – 41% порівняно з контролем.

Після введення лонгідази (1мл/кг) кількість сполучної тканини в досліджуваних препаратах значно зменшилася. Це відно-

силося до всіх досліджуваних показників. Кількість сполучної в різні періоди після ініціації фіброзу зменшилась на 38%, максимальна товщина фіброзного шару – на 43%. Найсуттєвіші зміни проявились у зменшенні загальної площі фіброзного утворення – на 68 % через 10 діб (див. рис. 4).

Одночасне введення дипроспану і лонгідази в співвідношеннях 1:1 в загальній дозі 1мг/кг проявило значний синергічний ефект (див. рис. 3,4). Слід відзначити, що сумісна протифіброзна дія цих двох лікарських препаратів є сильнішою, ніж сума дії цих двох ліків при їх роздільному використанні. Так, зменшення максимальної товщини фіброзного шару становило 49%, порівняно з контрольними значеннями, а загальної площі фіброзного утворення – 46 %.

Адекватність аналізу отриманих результатів ускладнюються участю багатьох чинників розвитку сполучнотканинних утворень при епідуральних фіброзах спинного мозку. Значний інтерес представляє гіпотеза, що головним патогенетичним чинником утворення фіброзних структур спинного мозку є імунініфільтративний асептичний запальний процес [6]. Механічні пошкодження у фіброзному кільці міжхребцевого диска сприяють просочуванню елементів пульпозного ядра в

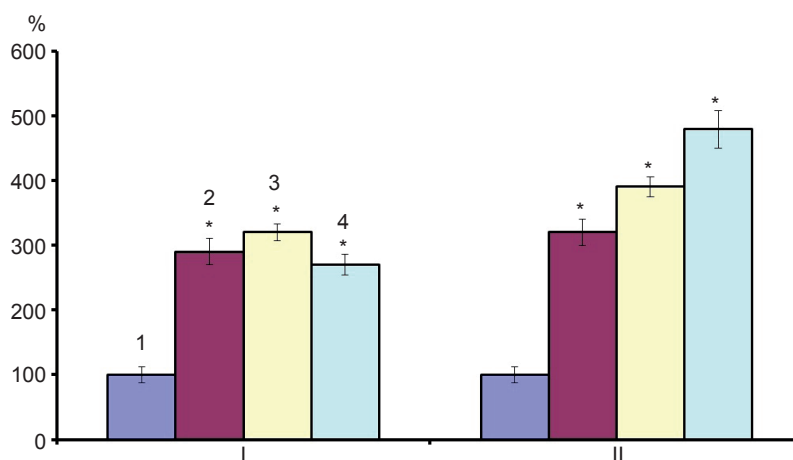


Рис. 2. Морфологічні зміни тканини спинного мозку щура в різні періоди після його ініціації, відображені в відсотках від контрольних значень: I, II - 5 та 10 діб після активації фіброзу відповідно - 1 – контроль; 2 - кількість елементів сполучної тканини; 3 - максимальна товщина прошарку сполучної тканини; 4 - загальна площа фіброзного утворення.

* $P \leq 0,05$

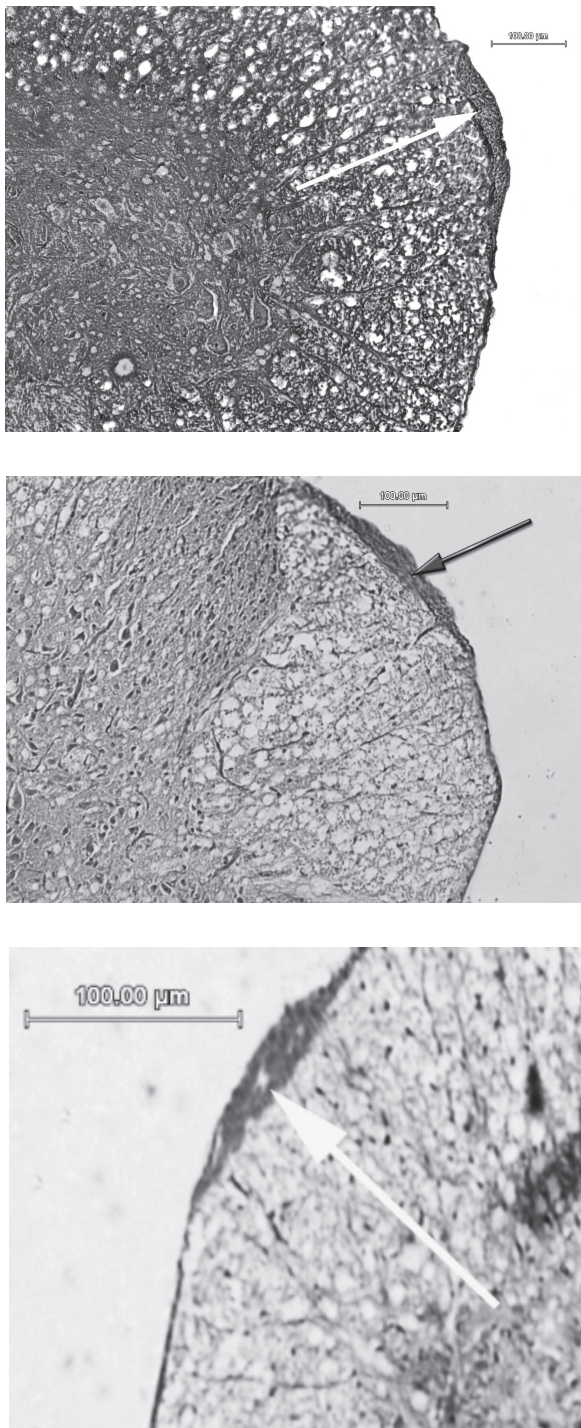


Рис. 3. Поперечний переріз спинного мозку щура при епідуральному фіброзі, викликаному методом механічного травмування міжхребцевих дисків, після введення дипроспану (а), лонгідази (б) в концентрації 1мл/кг, та їх суміші (0,5мл/кг;в). Світлова мікроскопія, x100. Стрілками показані місця виникнення фіброзних структур

епідуральний простір, багатий на кровоносні судини. Ці елементи викликають утворення антитіл, які ініціюють реактивно-запальні зміни в корінцях епідуральних клітин спинномозкових оболонки [7].

Відомо, що дипроспан має високу глюкокортикостероїдну активність та незначну мінералокортикостероїдну активність [8]. Бетаметазон, котрий входить до його складу, чинить сильну протизапальну, протиалергійну та імуносупресивну дію [9] що, на нашу думку, має важливий внесок у формування описаних ефектів. Як відомо глюкокортикостероїди пенетрують через клітинні мембрани і утворюють комплекси зі специфічними рецепторами цитоплазми [10-13]. Ці комплекси потім проникають у клітинне ядро, зв'язуються з ДНК і стимулюють транскрипцію інформаційної РНК і подальший синтез білків різних ензимів. Основні аспекти цих властивостей можуть бути такими: зменшення імуноактивних клітин на рівні осередку запалення, зменшення вазодилатації, стабілізація лізосомальних мембран, пригнічення фагоцитозу, зменшення продукування простагландинів і споріднених сполук [14-16]. Саме на протизапальних, імунодепресивних та протиалергійних властивостях глюкокортикоїдів може ґрунтуватись описана регуляторна дія дипроспану, а саме зниження епідуральної рубцевої адгезії у щурів та гальмування розвитку фіброзу або зменшення щільності фіброзної тканини [8].

Значно вищий клінічний ефект лонгідази, ніж нативної гіалуронідази [11] можна пояснити тим, він являє собою кон'югат протеолітичного ферменту гіалуронідази з високомолекулярним носієм з групи похідних п-оксиду полі-1,4-етиленпіперазину. Кон'югація підвищує стійкість ферменту до дії температури і інгібіторів, збільшує його активність і призводить до пролонгації дії. Ковалентний зв'язок лонгідази забезпечує одночасну локальну присутність протеолітичного ферменту і носія, здатного зв'язувати інгібітори, що вивільняються, ферменту і

стимулятори синтезу колагену (іони заліза, мідь, гепарин тощо). Завдяки вказаним властивостям лонгідаза здатна деполімеризувати матрикс сполучної тканини у фіброзно-гранулематозних утвореннях, але і пригнічувати зворотню регуляторну реакцію, направлену на синтез компонентів сполучної тканини. Специфічним субстратом тестикулярної гіалуронідази є глікозаміноглікани (гіалуронова кислота, хондроїтин, хондроїтин-4-сульфат, хондроїтин-6-сульфат), складові основу матриксу сполучної тканини. В результаті деполімеризації (розриву зв'язку між C₁ ацетилглюкозаміну і C₄ глюкуроною або індуроною кислоти) під впливом гіалуронідази глікозаміноглікани втрачають свої основні властивості: в'язкість, здатність зв'язувати воду, іони металів. Внаслідок цього ускладнюється формування колагенових білків у волокна, підвищується проникність тканинних бар'єрів, полегшується рух рідини в міжклітинному просторі, покращується еластичність сполучної тканини, що виявляється в зменшенні набрякості тканини, сплюсненні рубців, збільшенні об'єму руху суглобів, зменшенні контрактур і запобіганні їх формуванню, зменшенні спаєчного процесу. Гіалуронідаза має суттєву протифіброзну дію, але при введенні вона природно викликає алергічну реакцію, і у зв'язку з цим, проти її

дії направлена безліч ферментів як руйнівних так, і інактивуючих. Крім того, гіалуронідаза інактивується при підвищенні температури. А у вогнищі запалення температура зазвичай підвищена. Оскільки у кожному конкретному випадку складно визначити вектор порушення імунної відповіді необхідний препарат, який міг би протистояти патологічному зростанню сполучної тканини як в разі ослаблення, так і гіперактивності імунної системи. Свій внесок повинна зробити і протиалергічна дія обох використаних препаратів, яка розвивається в результаті зниження синтезу і секреції медіаторів алергії, гальмування вивільнення з сенсibiliзованих клітин і базофілів гістаміну і інших біологічно активних речовин, зменшення числа циркулюючих базофілів, пригнічення проліферації лімфоїдної і сполучної тканини [11,14,15]. Описані нами ефекти дипроспану та лонгідази можуть бути пов'язані також і з їх протизапальною дією. Тому, на нашу думку, одночасна дія лонгідази та дипроспану виявляє яскраво виражений синергічний ефект протидії утворення фіброзних структур. Завдяки протизапальній дії та здатності гальмувати епідуральну рубцевою адгезію цей комплекс є перспективним для його терапевтичних впроваджень при лікуванні епідурального фіброзу спинного мозку.

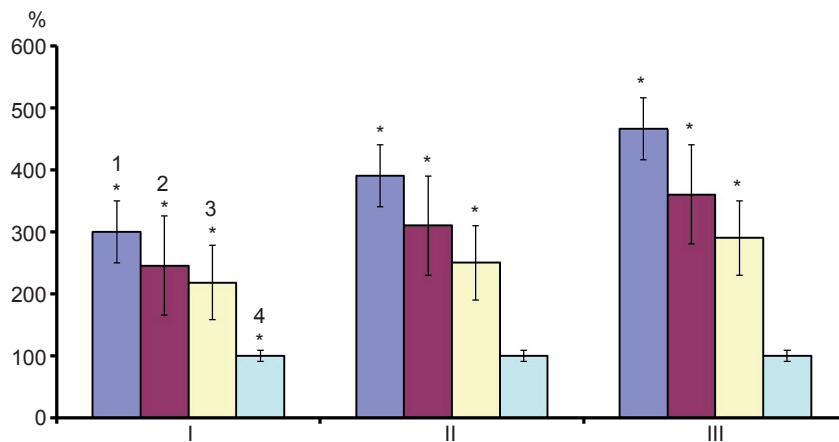


Рис. 4. Морфологічні зміни тканини спинного мозку щура при дії дипроспану (1), лонгідази (2) 1мл\кг, та їх суміші (3) 0,5мл\кг. відображені в відсотках від контрольних –значень -4. I - кількість сполучної тканини; II - максимальна товщина прошарку сполучної тканини; III- загальна площа фіброзного утворення.

* P<0,05

ВИСНОВКИ

1. Результати проведеного дослідження підтвердили можливість екзогенної регуляції реактивного формування сполучної тканини спинномозкового каналу після механічного пошкодження міжхребцевого диска.

2. Одночасне епідуральне введення гіалуронідази та бетаметазону виявляє вірогідну високу антифіброзну активність. Завдяки протизапальній дії та здатності гальмувати процес утворення сполучної тканини цей комплекс може бути застосований для цілеспрямованої регуляції активності процесу фіброзування спинномозкового каналу.

Я.В. Фищенко, Д.О. Заводовский, О.М. Мотузюк, Т.Ю. Матвиенко, Д.М. Ноздренко

ПРОТИВОФИБРОЗНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИПРОСПАНА, ЛОНГИДАЗЫ И ИХ КОМБИНАЦИЙ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ МЕЖПОЗВОНОЧНЫХ ДИСКОВ У КРЫС

Исследован процесс формирования фиброза оболочек спинного мозга взрослых крыс, вызванный механическим повреждением межпозвоночных дисков с эпидуральным введением смеси препаратов лонгидаза и дипроспан. Эпидуральное введение гиалуронидазы и бетаметазона в составе препаратов дипроспан и лонгидазы, проявило высокий синергетический эффект и антифиброзную активность. Противовоспалительное действие комбинации этих двух препаратов существенно превышало суммарный эффект при их раздельном использовании. Так, уменьшение максимальной толщины фиброзного слоя составило соответственно 49%, по сравнению с контрольными значениями, а уменьшении общей площади фиброзного образования - 46%. Выявлено противовоспалительное действие комплекса, которое усиливает положительный эффект препаратов, позволяет говорить о перспективе его использования для предупреждения эпидурального фиброза спинного мозга.

Ключевые слова: фиброз; соединительная ткань; дипроспан; лонгидаза.

²I.V.Fishchenko, ¹D.O.Zavodovskiy,

³O.M.Motuzuyk, ¹T.Yu.Matvienko,

¹D.N.Nozdrenko

DIPROSPAN, LONGIDAZA AND THEIR COMBINED ACTION AGAINST FIBROSIS CAUSED BY MECHANICAL INJURY OF THE INTERVERTEBRAL DISCS IN RATS.

The formation of connective tissue changes in the spinal canal

of rats, caused by the method of intervertebral disc ruptures, in association with a mixture of epidural injection of longidaza and diprospan has been researched. Simultaneous injection of hyaluronidase and betamethasone in composition of diprospan and longidaza, revealed a high synergistic effect and anti-fibrotic activity. Combined antifibrosis action of these two drugs is stronger than the sum of the actions of the two drugs in their separate use. Reduction of the maximum thickness of the fibrous layer was 49%, compared with the reference value and reduction of the total area of the fibrous formation was 46%. In our opinion, due to anti-inflammatory effects and the ability to reduce epidural scar adhesion, this complex is promising for its therapeutic use in treatment of spinal epidural fibrosis. Key words: fibrosis; connective tissue; diprospan; longidaza.

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre, Institute of Biology, Kyiv;

²SI «Institute of traumatology and orthopedics of NAMN of Ukraine», Kyiv;

³Eastern European National University named after Lesia Ukrainka, Lutsk.

REFERENCES

1. Riordan JR I, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989; 245: 1066-73.
2. Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003; 500-3.
3. Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol*. 2000; 19: 325-32.
4. Zhulev NM, Badzgaradze JD, Zhulev SN. Osteochondrosis vertebralis. SPb.: Lan; 2011. [Russian].
5. Menendez MI, Phelps MA, Bertone AL. Pharmacokinetics of intra-articular betamethasone sodium phosphate and betamethasone acetate and endogenous hydrocortisone suppression in exercising horses. *J Vet Pharmacol Ther*. 2016; 39: 22-6.
6. Dyakonova VA., Dambaeva VA., Dambaeva SV, Khaitov R.M. Study of interaction between the polyoxonium immunomodulator and the human immune system cells. *Int Immunopharmacol*. 2004; 15(13): 1615-23.
7. Simonovich AE, Baykalov AA. Surgical treatable of the pain syndrome`s secondary infection after hernia excision of lumbar intervertebral cartilages. *Spin surg*. 2005; 3: 87-92. [Russian].
8. Habib G, Zahran R, Najjar R, Badarny S, Jabbour A, Artul S, Hakim G, Jabaly-Habib H. The effect of intra-articular injection of Diprospan at the knee joint on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Swiss Med Wkly*. 2015; 145: w14134.
9. Habib G, Artul S, Chernin M, Hakim G, Jabbour A. The effect of intra-articular injection of betamethasone acetate/betamethasone sodium phosphate at the knee

- joint on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: a case-controlled study. J Investig Med. 2013; 61(7):1104-7.
10. Korzhevsky DE. Summary of histologic technique's fundamentals for doctors and histotechnologists. St. Petersburg; 2005. [Russian].
 11. Leena James, Akshay Shetty, Diljith Rishi, Marin Abraham, Management of Oral Submucous Fibrosis with Injection of Hyaluronidase and Dexamethasone in Grade III Oral Submucous Fibrosis: A Retrospective Study. J Int Oral Health. 2015; 7: 82-5.
 12. Papagelopoulos PJ, Petrou HG, Triantafyllidis PG. Treatment of lumbosacral radicular pain with epidural steroid injections. Orhtopedics. 2001; 24 (2): 145 – 9.
 13. Benzoni HT. Epidural steroid injections for low back pain and lumbosacral radiculopathy. Pain. 1986; 24 (3): 277- 95.
 14. Isaeva NV, Dralyuk MG. Basic principles of treatment and prevention postoperative epidural fibrosis of patient lumbar osteochondrosis. Neurosurgery. 2010; 3: 74-9. [Russian].
 15. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. J. Pathol. 2003: 504-15.
 16. Robertson JT. Role of peridural fibrosis in the failed back: a review Eur. Spine J. 1996; 5(1): 2-6.

*Матеріал надійшов
до редакції 25.04.2016*