



Вплив препарату «Ефіаль» на функціональний стан хондроцитів

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків,
²ПАТ «Фармак», м. Київ

Ключові слова: спрей, ліпосоми, хондроцити, функціональний стан.

У ПАТ «Фармак» розробили препарат «Ефіаль» у формі спрею на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней і фосфатидилхоліну з соєвих бобів для лікування ран різної етіології. Здійснили дослідження впливу препарату на функціональний стан хондроцитів за умов культивування. Виявили, що додавання препарату під час посіву та на 3 добу культивування хондроцитів у концентраціях від 70 мкг/мл до 1,5 мкг/мл у ростове середовище призводило до зниження вмісту глікозаміногліканів і колагену II типу. Застосування препарату в концентраціях від 0,15 мкг/мл до 1,5 нг/мл зумовлювало збільшення глікозаміногліканів на 17,1±2,3% (якщо додавали під час посіву) та на 19,4±2,5% (додавання на 3 добу культивування), збільшення вмісту колагену II типу в культурі хондроцитів на 10,3±1,7% (якщо додавали на 3 добу культивування) і відсутність впливу на цей показник, якщо додавали під час посіву (0,1–1,7×10⁵ клітин).

Влияние препарата «Эфиаль» на функциональное состояние хондроцитов

Н. А. Волкова, А. Н. Гольцев, Г. И. Борщевский, М. И. Борщевская

На ПАО «Фармак» разработан препарат «Эфиаль» в форме спрея на основе концентрата депротейнизированного дермального слоя кожи свиней и фосфатидилхолина из соевых бобов для лечения ран различной этиологии. Исследовали влияние препарата на функциональное состояние хондроцитов в условиях культивирования. Установили, что добавление препарата в концентрациях от 70 мкг/мл до 1,5 мкг/мл при посеве и на 3 сутки культивирования в питательную среду приводило к снижению содержания гликозаминогликанов и коллагена II типа. Использование препарата в концентрациях от 0,15 мкг/мл до 1,5 нг/мл обуславливало увеличение гликозаминогликанов на 17,1±2,3% (в условиях добавления при посеве) и на 19,4±2,5% (в условиях добавления на 3 сутки культивирования), повышение содержания коллагена II типа в культуре хондроцитов на 10,3±1,7% (в условиях добавления на 3 сутки культивирования), отсутствие влияния на исследуемый показатель в условиях добавления при посеве (0,1–1,7×10⁵ клеток).

Ключевые слова: спрей, липосоми, хондроциты, функциональное состояние.

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2014. – № 3 (16). – С. 52–55

The influence of «Efiyal» medicine on the chondrocytes functional state

N. A. Volkova, A. N. Goltsev, G. I. Borshevskiy, M. I. Borshevskaya

Aim. The effect of «Efiyal» medicine on the chondrocytes functional state in conditions of cultivation has been examined in our work. **Materials and Results.** Adding of medicine at concentrations from 70 µg/ml to 1,5 µg/ml during sowing and on 3rd day of cultivation into nutrient medium resulted in reduction of glycosaminoglycans (GAG) content and type II collagen comparing to control (without medicine). Using the test medicine at concentrations from 0,15 µg/ml to 1.5 ng/ml caused an increase of GAG on 17,1±2,3% (in terms of adding during sowing) and on 19,4±2,5 (in terms of adding on 3rd day of cultivation), and an increase in content of type II collagen in the chondrocytes culture on 10,3±1,7% (in terms of adding on day 3rd day of cultivation) and no effect on the studied parameters in terms of adding during sowing (0,1–1,7×10⁵ cells). All data is given versus control.

Key words: Aerosols, Liposomes, Chondrocytes, Functional State.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2014; № 3 (16): 52–55

У сучасній ортопедії актуальною є проблема відновлення суглобового хряща. Висока частота ушкоджень, складність клінічної діагностики та лікування уповільнюють відновлення функції хрящової тканини і призводять до розвитку остеоартрозу, а в деяких випадках і до інвалідності. Суглобовий хрящ є високоспеціалізованою тканиною, характеризується відсутністю кровопостачання, низькою кількістю клітинних елементів, котрі розміщені в матриксі, який складається із колагену, протеогліканів, неколагенових білків і води.

На фармацевтичному ринку країни є невелика кількість лікарських засобів тваринного походження, що виготовлені на основі пептидних комплексів, які містяться

у шкірі свиней. Це обґрунтовує необхідність розробки і створення таких препаратів. Наявність у шкірі свиней різних хімічних сполук органічної та неорганічної природи (нуклеотидів, гліколіпідів, амінокислот, олігопептидів, електролітів, мікроелементів, вуглеводів, ліпідів і продуктів їх обміну) зумовлює активність лікарських засобів тваринного походження [1,2]. Хімічний склад шкіри свиней надзвичайно різноманітний, але найбільше в ній міститься мукополісахаридів, глікогену, глюкози. Отже, створення препаратів на основі низькомолекулярних пептидів, що виділені зі шкіри свиней, інкорпоровані в ліпосоми і мають специфічну ранозагоювальну активність під час лікування глибоких ран, є актуальним напрямом сучасної медицини і фармації [1–3,5].

Нинішні методи обробки шкіри свиней дають можливість отримати високотехнологічні продукти, що відповідають високим вимогам, які ставлять до препаратів тваринного походження. Зокрема, з метою зниження алергізуючих властивостей препаратів, що виготовлені на основі біологічної сировини, здійснюють депротейнізацію біологічного субстрату, залишаючи в ньому інші активні компоненти. Саме шляхом депротейнізації шару шкіри свиней на ПАТ «Фармак» (м. Київ) розробили препарат «Ефіаль» у формі спрею на основі пептидних комплексів шкіри свиней, у перерахунку на пептиди – 0,137 мг/мл. Препарат стандартизований біологічно та хімічно, пройшов доклінічні дослідження [4].

Для лікування пошкоджень суглобового хряща використовують препарати, що є тканинспецифічними стимуляторами регенерації. У більшості препаратів здатність стимулювати регенерацію хряща поєднується з іншими ефектами: протизапальним, антиоксидантним, антибактеріальним. Призначають препарат для стимуляції регенерації термальної і сполучної тканини в ділянці ураження.

Мета роботи

Дослідити вплив препарату «Ефіаль» на функціональний стан хондроцитів в умовах культивування.

Матеріали і методи дослідження

Використали хондроцити суглобового хряща щурів, які отримали методом ферментативної дезагрегації [9]. Культивували на середовищі IMDM (Sigma, США) із 10% FCS (v/v) виробництва HyClone (США) з додаванням пеніциліну/стрептоміцину (РАА, Австрія) і амфотеріцину В (РАА, Австрія). У всіх дослідах посівна концентрація хондроцитів становила $1,2 \times 10^4$ клітин/см². Культивування виконали в умовах стерильного боксового приміщення в інкубаторі Sanyo при 37°C із 5% вмістом CO₂ у вологій атмосфері. Середовище культивування змінювали кожну третю добу. Пасажи провели після досягнення культурою моношару. Для переведення клітин у суспензійний стан моношар обробили сумішшю 0,02% розчину Версена (ГУП ПВЕ ім. М.П. Чумакова РАМН) і 0,25% розчину трипсину (РАА, Австрія) у співвідношенні 4:1. Клітинну концентрацію підраховували в камері Горяєва загальноприйнятим способом [6].

Вивчили препарат «Ефіаль» із концентрацією пептидів 0,137 мг/мл. Діапазон концентрацій – 70,0, 7,6, 1,5, 0,15 мкг/мл та 75,0, 15,0, 1,5 нг/мл. Препарат додавали до середовища культивування клітин під час посіву та на 3 добу культивування. Контролем (група порівняння) були культури хондроцитів, які культивували у тих самих умовах, але без додавання препарату.

Функціональний стан хондроцитів при взаємодії із препаратом «Ефіаль» вивчили на наявність глікозаміногліканів за допомогою фарбування Toluidine blue (Fluka, ФРН). У світловому мікроскопі підраховували кількість клітин із глікозаміногліканами (ГАГ) в екстрацелюлярному матриксі, що були профарбовані синім кольором, і визначили їхній відсоток від загальної кількості клітин

[8]. Забарвлення на колаген II типу провели з використанням моноклональних антитіл до колагену II типу (1:200, Sigma-Aldrich, США) та FITC-conjugate (Sigma-Aldrich, США) згідно з інструкцією фірми-виробника. Люмінесцентну мікроскопію здійснили за допомогою флуоресцентного мікроскопа (МИКМЕД-2, Російська Федерація). У цих дослідах для візуалізації ядер клітин додатково фарбували propidium iodide (25 мМ/л, Sigma-Aldrich, США). Кількість клітин із наявністю колагену II типу (зелене світіння) підраховували в люмінесцентному мікроскопі та визначили їхній відсоток від загальної кількості клітин [7,8].

За допомогою програми Statistica 8 підраховували значення ED₅₀ для препарату. Проаналізували кілька полів зору, підраховували не менш ніж 500 клітин. Результати наведені у процентах від загальної кількості клітин у вигляді середніх арифметичних і стандартних похибок середніх (M±m), критичним значення рівня значущості вважали при 0,05. Статистично результати опрацювали за допомогою Microsoft Excel і Statistica 8 із використанням непараметричних критеріїв.

Результати та їх обговорення

Здійснили дослідження зі встановлення впливу препарату на функціональний стан хондроцитів (вміст глікозаміногліканів і колагену II типу) за умов його додавання під час посіву та на 3 добу культивування. Дані щодо вмісту ГАГ наведені на *рис. 1*. Взаємодія хондроцитів із препаратом «Ефіаль» (додавання під час посіву) в концентраціях 70,0–1,5 мкг/мл призводила до вірогідного зниження синтезу ГАГ у порівнянні з контролем, при цьому застосування концентрації від 0,15 мкг/мл до 1,5 нг/мл сприяло збільшенню показника на 17,1±2,3%.

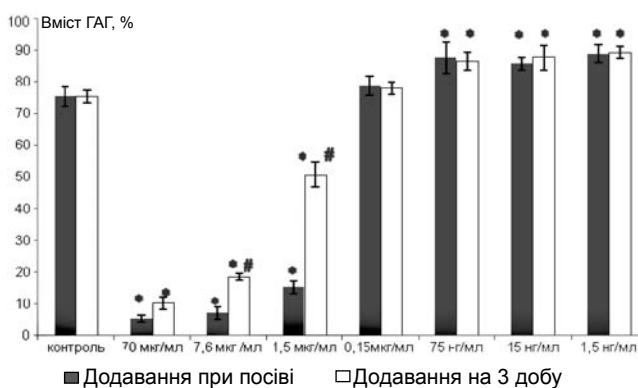


Рис. 1. Вміст ГАГ у культурі хондроцитів на 7 добу культивування за наявності препарату «Ефіаль» (забарвлення Toluidine blue).

Примітка: * – різниця статистично значуща щодо контролю (P<0,05; n=5); # – різниця статистично значуща між зразками однієї концентрації за різних умов додавання (P<0,05; n=5).

Взаємодія хондроцитів із препаратом «Ефіаль» (якщо додавали на 3 добу) в концентраціях 70,0 і 1,5 мкг/мл призводила до зниження синтезу ГАГ у порівнянні з контролем. Використання концентрацій від 0,15 мкг/мл до 1,5 нг/мл зумовлювало збільшення показника на 19,4±2,5%. Засто-

сування препарату на 3 добу культивування призводило до суттєвішого підвищення вмісту ГАГ у хондроцитах у порівнянні з додаванням препарату під час посіву при концентраціях 7,6 мкг/мл – у 2,6 раза, 1,5 мкг/мл – у 3,3 раза.

Результати дослідження вмісту колагену II типу в хондроцитах наведені на *рис.2*. Взаємодія хондроцитів із препаратом «Ефіаль» (додавання під час посіву) в концентраціях від 70 мкг/мл до 75 нг/мл призводила до зниження вмісту колагену II типу в порівнянні з контролем. Використання концентрацій 0,15–1,5 нг/мл не спричиняло до вірогідних змін показника, який досліджували, щодо контролю.

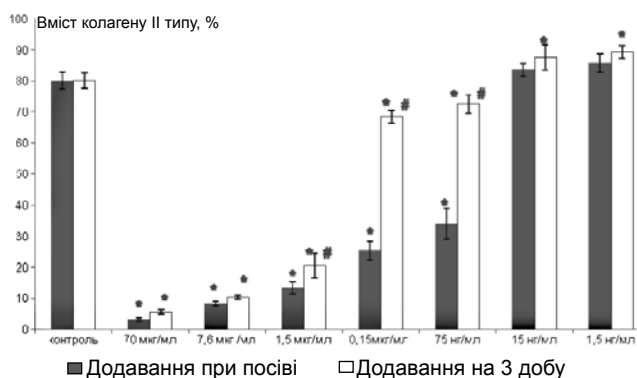


Рис. 2. Вміст колагену II типу в культурі хондроцитів на 7 добу культивування з використанням препарату «Ефіаль» (імунологічне забарвлення на колаген II типу).

Примітки: * – різниця статистично значуща щодо контролю ($P < 0,05$; $n = 5$); # – різниця статистично значуща між зразками однієї концентрації за різних умов додавання ($P < 0,05$; $n = 5$).

Взаємодія хондроцитів із препаратом «Ефіаль» (якщо додавали на 3 добу) в концентраціях 70,0–1,5 мкг/мл призводила до зниження вмісту колагену II типу в порівнянні з контролем. Використання концентрацій від 0,15 до 1,5 нг/мл зумовлювало збільшення показника на $10,3 \pm 1,7\%$ щодо контрольних зразків.

Слід відзначити, що застосування препарату на 3 добу культивування призводило до суттєвішого ефекту підвищення вмісту колагену II типу в хондроцитах у порівнянні з додаванням під час посіву клітин. Зокрема, при дозі препарату 1,5 мкг/мл цей показник був збільшений в 1,5 раза, при 0,15 мкг/мл – 2,7 раза, 75 нг/мл – 2,1 раза. Цей ефект препарату, можливо, пов'язаний із тим, що на час додавання препарату (3 доба) у клітинах уже завершені процеси адгезії та відбувається стимуляція проліферації, коли є активізація біосинтетичних процесів у хондроцитах.

Отже, дослідження свідчать, що застосування концентрацій препарату від 70,0 до 0,15 мкг/мл призводить до порушення синтетичних процесів у хондроцитах. Використання концентраційного діапазону від 15,0 до 1,5 нг/мл ($ED_{50} = 6,3$ нг/мл) виявляє стимулювальний ефект на синтез глікозаміногліканів і колагену II типу в хондроцитах ($0,1-1,7 \times 10^5$ клітин) в умовах культивування, зокрема, якщо вводити препарат при островцевому рості (3 доба культивування).

Висновки

Застосування препарату «Ефіаль» у концентраціях 75,0–1,5 нг/мл призводить до вірогідного збільшення вмісту глікозаміногліканів у культурі хондроцитів на $17,1 \pm 2,3\%$ (якщо додавати під час посіву) та на $19,4 \pm 2,5\%$ (якщо додавати на 3 добу культивування).

Застосування препарату «Ефіаль» у концентраціях 15,0–1,5 нг/мл зумовлює вірогідне збільшення (на $10,3 \pm 1,7\%$) вмісту колагену II типу в культурі хондроцитів (якщо додавати на 3 добу культивування).

Результати дослідження щодо впливу препарату «Ефіаль» на функціональний стан хондроцитів є базою для вивчення ефективності використання препарату в лікуванні пошкоджень суглобового хряща.

Список літератури

1. Комплексное лечение гнойно-некротических осложнений диабетической стопы / В.И. Бондарев, Р.В. Бондарев, А.А. Орехов и др. // Хірургія України. – 2010. – №4. – С. 72–76.
2. Зупанец І.А. Влияние комбинации глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом на апоптоз хондроцитов в условиях развития системного стероидного артроза у крыс / И.А. Зупанец, В.А. Туляков, С.К. Шебеко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т.75. – №4. – С. 34–37.
3. Комплексне лікування пацієнтів з венозними трофічними виразками / І.І. Кобза, Р.В. Радиш, Р.А. Жук та ін. // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2010. – Т.11. – №4. – С. 438–441.
4. Коваленко В.М. Безпечність препарату Ефіаль, спрей, виробництва ПАТ «Фармак» / В.М. Коваленко, Г.І. Борщевський, А.К. Вороніна // Український біофармацевтичний журнал. – 2013. – Т.29. – №6. – С. 31–36.
5. Возможность применения депротенизированного гемодеривата крови телят (Солкосерил) при лечении облитерирующих заболеваний нижних конечностей /

- В.Г. Мишалов, И.И. Теслюк, Е.С. Заводовский, А.В. Мишалова // Серце і судини. – 2011. – № 1. – С. 102–106.
6. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы / Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 333 с.
7. Cavallo C. Chondrogenic differentiation of bone marrow concentrate grown onto a hyaluronan scaffold: Rationale for its use in the treatment of cartilage lesions / C. Cavallo, G. Desando, M. Columbaro et al. // J. of biomed. materials research. – 2013. – Vol. 101. – Issue 6. – P. 1559–1570.
8. Fernandes A.M Similar properties of chondrocytes from osteoarthritis joints and mesenchymal stem cells from healthy donors for tissue engineering of articular cartilage / A.M. Fernandes, S.R. Herlofsen, T.A. Karlsen et al. // J. of biomed. materials research. – 2013. – Vol. 8. – Issue. 5. – P. 62–94.
9. Xin-xin, Sh. Serum-free media for articular chondrocytes in vitro expansion / N.A. Duncan, L. Lin et al. // Chinese Medical Journal. – 2013. – Vol. 126(13). – P. 2523–2529.

References

1. Bondarev, V. I., Bondarev, R. V., Orekhov, A. A., et al. (2010). Kompleksnoe lechenie gnojno-nekroticheskikh oslozheniy diabetichejskoj stopy [Complex treatment of purulent-necrotic complications of the foot in diabetes]. *Hirurgiia Ukrainy*, 4,

- 72–76. [in Ukrainian].
- Zupanets, I.A., Tulyakov, V. A., & Shebeko, S. K. (2012) Vliyanie kombinatsii glukozamina gidrokhlorida s paracetamolom na apoptoz hondrocytov v usloviyakh razvitiya sistemnogo steroidnogo artroza u kryss [Effect of Glucosamine Hydrochloride in Combination with Paracetamol on Chondrocyte Apoptosis under Conditions of Systemic Steroidal Arthritis Development in Rats]. *Ekspyrymental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 4, 34–37. [in Russian].
 - Kobza, I. I., Radish, R. V., Zhuk, R. A., et al. (2010). Kompleksne likuvannya patsiyentiv z venoznymy trofichnymy vyrazkamy [Complex treatment of patients with venous trophic ulcers]. *Vestnik neotlozhnoj i vosstanovitel'noj medicyny*, 11(4), 438–441. [in Ukrainian].
 - Kovalenko, V. M., Borschevskiy, G. I., & Voronina, A. K. (2013) Bezpechnist' preparatu Efial', sprej, vyrobnytstva PAT «Farmak» [The safety of the drug Efial, spray of JSC «Farmak»]. *Ukrainskyi biofarmatsevtichnyi zhurnal*, 6, 31–36. [in Ukrainian].
 - Mishalov, V. G., Teslyuk, I. I., Zavodovskij, E. S., & Mishalova, A. V. (2011) Vozmozhnost' primeneniya deproteinizirovannogo gemoderivata krovi telyat (Solkoserila) pri lechenii obliteratediruyuschikh zabolevaniy nizhnikh konechnostej [The possibility of applying deproteinised gemoderivat calf blood (Solcoseryl) in the treatment of occlusive diseases of the lower extremities]. *Sertse i sudyny*, 1, 102–106. [in Ukrainian].
 - Freshni, R. (1989) *Kul'tura zhyvotnykh kletok. Metody [Culture of animal cells. Methods]*. Moscow: Mir. [in Russian].
 - Cavallo, C., Desando, G., Columbaro, M., et al. (2013). Chondrogenic differentiation of bone marrow concentrate grown onto a hyaluronan scaffold: Rationale for its use in the treatment of cartilage lesions. *J. of biomed. materials research*, 101(6), 1559–1570. doi: 10.1002/jbm.a.34460.
 - Fernandes, A. M., Herlofsen, S. R., Karlsen, T. A., et al. (2013) Similar properties of chondrocytes from osteoarthritis joints and mesenchymal stem cells from healthy donors for tissue engineering of articular cartilage. *J. of biomed. materials research*, 8(5), 62–94.
 - Xin-xin, Sh., Duncan, N. A., Lin, L., et al. (2013) Serum-free media for articular chondrocytes in vitro expansion. *Chinese Medical Journal*, 126(13), 2523–2529.
-

Відомості про авторів:

Волкова Н.О., к. біол. н., ст. наук. співроб., зав. лабораторії біотехнології і прикладних нанотехнологій, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, E-mail: volkovanatali2006@yandex.ru.

Гольцев А.М., академік НАН України, директор, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Борщевський Г.І., к. фарм. н., зав. лабораторії розробки технології лікарських препаратів, ПАТ «Фармак».

Борщевська М.І., д. фарм. н., професор, керівник департаменту біотехнології, ПАТ «Фармак».

Надійшла в редакцію 16.06.2014 р.