

## РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

### ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ГЛЮКОЗАМИНА ГИДРОХЛОРИДА С ПАРАЦЕТАМОЛОМ НА АПОПТОЗ ХОНДРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ СИСТЕМНОГО СТЕРОИДНОГО АРТРОЗА У КРЫС

И. А. Зупанец<sup>1</sup>, В. А. Туляков<sup>2</sup>, С. К. Шебеко<sup>1</sup>

В суставном хряще крыс с экспериментальной кортикостероидной дистрофией отмечено значительное увеличение доли хондроцитов, вовлеченных в процессы апоптоза. Лечение животных комбинацией глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом существенно снижало процент апоптических хондроцитов. Выраженность антиапоптического эффекта исследованной комбинации мало отличалась от таковой у глюкозамина гидрохлорида и достоверно превосходила антиапоптическую активность парацетамола.

**Ключевые слова:** апоптоз, глюкозамина гидрохлорид, парацетамол, остеоартроз

#### ВВЕДЕНИЕ

Среди всех прописанных анальгетиков при остеоартрозе (ОА) 10 % составляет парацетамол [8]. Согласно рекомендациям Европейской организации артрологии (EULAR) и Международного общества исследования ОА (OARSI), парацетамол в дозе 1000 мг является препаратом первой линии при ОА [9, 10]. В ранее проведенных исследованиях отмечено положительное влияние комбинаций глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом на метаболизм макромолекул суставного хряща у животных при экспериментальной дистрофии [1]. Поскольку одним из основных механизмов авторегулирования и экзогенного регулирования жизнедеятельности хрящевой ткани является апоптоз хондроцитов [2], представляло интерес изучить процессы апоптоза в дистрофическом суставном хряще в условиях применения данной комбинации.

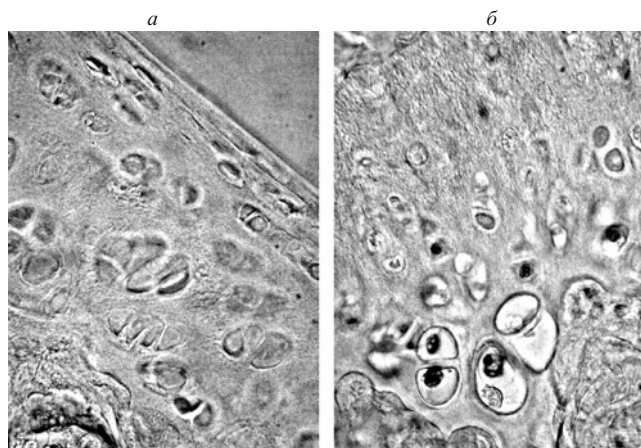
#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на модели кортикостероидной дистрофии у крыс [3] в нашей модификации, которую воспроизводили путем трехкратного внутримышечного введения дексаметазона фосфата (КРКА, Словения) в дозе 7 мг/кг с интервалом в 1 неделю [3]. В эксперименте были использованы 50 белых лабораторных крыс-самцов линии Вистар с массой тела 250 – 300 г, которых отбирали для исследования и случайным образом распределяли на 5 опытных групп по

10 животных в каждой: 1 — интактный контроль; 2 — контрольная патология (модель остеоартроза без лечения); 3 — крысы, леченные глюкозамина гидрохлоридом (“Protein Chemicals”, Япония) в дозе 50 мг/кг; 4 — крысы, леченные парацетамолом (ОАО “Дарница”, Украина) в дозе 20 мг/кг; 5 — крысы, получавшие комбинацию глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом (5:2) в дозе 70 мг/кг (по сумме действующих веществ). Исследуемые субстанции и комбинацию вводили в виде экстенпоральной суспензии 1 раз в сутки ежедневно в желудок на протяжении 28 суток. Лекарственную форму готовили без стабилизатора на физиологическом растворе из расчета 1 мл на одно животное. На 56-й день эксперимента животных выводили из опыта декапитацией под эфирным наркозом, после чего у них были отсепарированы коленные суставы. Суставы фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине, подвергали декальцинации в 10 % растворе трилона Б, дегидратации в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Далее изготавливали срезы, которые монтировали на стеклах с помощью раствора поли-L-лизина. Срезы депарфинировали и подвергали специфическому окрашиванию с помощью наборов In Situ Cell Death detection Kit, AP фирмы “Roche” (Германия) для выявления апоптоза. Метод регистрации эффекта TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick and labeling) основан на мечении конца ДНК флюоресцеин-диуридинтрифосфатом (Ф-дУТФ) с последующим определением включенного флюоресцеина с антителами и их визуализацией, что является наиболее точным и специфическим для исследования апоптоза хондроцитов [6]. Регистрацию апоптического мечения осуществляли визуально с помощью светового микроскопа. Цифровые результаты подвергали непараметрическому статистическому анализу с использованием критерия Манна-Уитни

<sup>1</sup> Кафедра клинической фармакологии с фармацевтической опекой (зав. — проф. И. А. Зупанец) Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, 61057, Харьков, ул. Пушкинская, 27.

<sup>2</sup> Отдел лабораторной диагностики и иммунологии (зав. — Ф. С. Леонтьева) Государственное учреждение “Институт патологии позвоночника и суставов им. проф. М. И. Ситенко НАМН Украины”.



**Рис. 1.** *а* — Суставной хрящ коленного сустава интактных крыс. Отсутствие апоптического мечения; *б* — суставной хрящ коленного сустава контрольных крыс с остеоартрозом. Высокая плотность клеток с апоптическим мечением. TUNEL-реакция. Ув. 250.

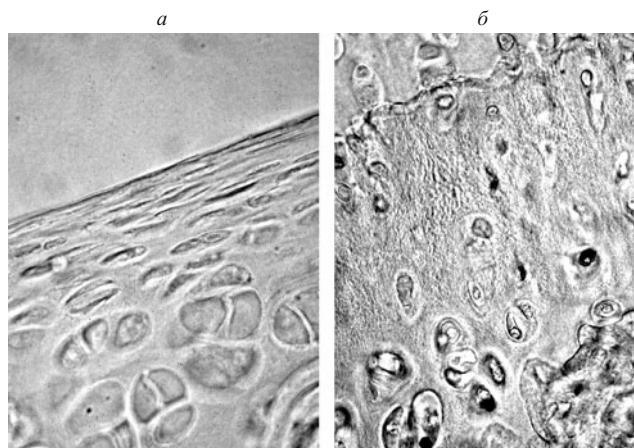
и определением статистической достоверности разности результатов [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе определения готовили микропрепараты с заведомо отсутствующим и заведомо присутствующим апоптическим мечением клеток (негативный и позитивный контроль, соответственно). Клетки, имеющие темное окрашивание по периметру ядра в цитоплазме, регистрировали как апоптоз-позитивные. В негативном контроле подобные клетки отсутствовали. Результаты морфометрического анализа состояния суставного хряща крыс по итогам TUNEL-реакции под воздействием исследуемых объектов представлены в таблице.

Уровень апоптоза клеток суставного хряща у интактных крыс не превышал 2 %. Основная часть хондроцитов отличалась позиционной специфичностью и классической цитоархитектоникой (рис. 1). Клетки на ранних стадиях апоптоза присутствовали в единичных количествах и характеризовались окрашиванием по периметру ядра.

После хронического воздействия избыточных доз дексаметазона от 50 до 70 % клеток суставного хряща находились на той или иной стадии апоптической гибели (таблица). Хотя TUNEL-позитивные клетки идентифицировались во всех слоях хряща, подавляющее большинство из них были локализованы в промежуточном и глубоком и содержали темно-окрашенные ядра, по периметру которых четко прокрашивался фрагментированный хроматин (рис. 1, *б*). В части клеток фрагменты ДНК выявлялись в цитоплазме в виде темных глыбок ядерного хроматина. Наблюдалось также нарушение зональности расположения клеток хряща. Часто определялись пустые лакуны. Иногда из двух клеток в одной лакуне лишь одна подвергалась апоптозу.



**Рис. 2.** *а* — Суставной хрящ коленного сустава крыс с остеоартрозом (ОА) под воздействием глюкозамина гидрохлорида. Отсутствие апоптического мечения хондроцитов; *б* — суставной хрящ коленного сустава крыс с ОА под воздействием парацетамола. Апоптическое мечение хондроцитов на разных стадиях хондроптоза. Низкая плотность клеток. Пустые лакуны. TUNEL-реакция. Ув. 250.

Лечение животных глюкозамина гидрохлоридом в дозе 50 мг/кг снижало количество хондроцитов, вступающих в апоптоз, приблизительно до 9 % (таблица). Сохранялась нормальная позиционная специфичность и цитоархитектоника. Присутствовали изогенные группы клеток, что свидетельствует об активации компенсаторных приспособлений ткани к неблагоприятным внешним воздействиям. Плотность хондроцитов в поле зрения при исследовании микропрепаратов была достаточно большой. Запустевшие лакуны и бесклеточные поля отсутствовали. В микропрепаратах мы находили TUNEL-позитивные клетки как одиночные экземпляры, расположенные преимущественно в промежуточном слое (рис. 2, *а*). Интенсивность их окраски варьировала от слабо базофильной до практически черной.

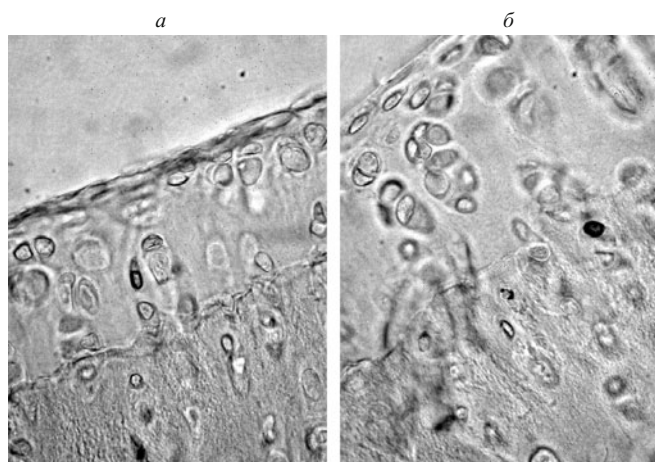
Лечение животных парацетамолом (20 мг/кг) снижало количество хондроцитов, вступивших в апоптоз, до 26,3 % (таблица). Как правило, подобные клетки находились на ранних стадиях апоптоза (рис. 2, *б*). В

### Морфометрическая характеристика суставного хряща крыс по результатам TUNEL-реакции под воздействием терапии

Исследуемый объект	TUNEL-позитивные клетки, %
Интактный контроль ( $n = 10$ )	$1,1 \pm 0,4$
Контрольная патология ( $n = 10$ )	$61,8 \pm 8,7^{1)}$
Глюкозамина гидрохлорид ( $n = 10$ )	$9,7 \pm 0,7^{1) 2)}$
Парацетамол ( $n = 10$ )	$26,3 \pm 2,6^{1) 2) 3)}$
Комбинация глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом ( $n = 10$ )	$11,2 \pm 1,0^{1) 2)}$

**Примечание.** Различия достоверны:

- 1) — относительно интактных животных;
- 2) — относительно группы контрольной патологии;
- 3) — относительно животных, получавших изученную комбинацию.



**Рис. 3.** Суставной хрящ коленного сустава крыс с остеоартрозом, под воздействием исследуемой комбинации. Нормальная цитоархитектоника хряща и позиционная специфичность хондроцитов. *а* — Одиночные хондроциты с апоптическим мечением на ранней стадии процесса; *б* — средняя частота апоптического мечения хондроцитов в виде пикноза ядер клеток. TUNEL-реакция. Ув. 250.

них прокрашивались цельные неизменные ядра, хотя иногда наблюдались остатки ДНК в цитоплазме. При этом погибали хондроциты как поверхностных, так и более глубоко лежащих слоев суставного хряща. Степень окраски ядер клеток, вступивших в апоптоз, была умеренной, менее выраженной, чем в позитивном контроле, что свидетельствует о меньшей интенсивности процессов дробления ДНК. Плотность хондроцитов была несколько снижена по сравнению с интактным контролем. На некоторых микропрепаратах отмечались небольшие бесклеточные поля.

В отличие от указанного выше, лечение животных комбинацией глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом приводило к снижению доли апоптических хондроцитов до 11 % (таблица). Микропрепараты суставного хряща крыс, леченных данной комбинацией, были приближены к интактным. Редко встречающиеся случаи хондроптоза характеризовались полиморфизмом (рис. 3, *а, б*). Большая часть апоптических хондроцитов находилась в начальной фазе процесса, визуально характеризующейся окрашиванием периметра ядра. Лишь небольшое их количество характеризовалось завершением процесса, а именно, полным сжатием ДНК ядра в плотный пикнотичный комочек с интенсивным черным окрашиванием. Запустевших лакун в данных микропрепаратах было мало. Плотность клеток оставалась высокой, в целом соответствуя таковой у интактных животных. На отдельных микропрепаратах были отмечены незначительные бесклеточные поля. Количество изогенных групп клеток и их число в каждой группе мало отличались от такового у интактных животных. Хондроциты были крупными, хорошо развитыми. В случае большей завершенности процесса хондроптоза, визуально проявлявшегося в виде массовой пикнотизации хондроцитов, это сопровождалось

более активным образованием множества изогенных групп.

Сопоставление уровня апоптоза у интактных животных и животных с вызванной патологией доказывает, что клеточная гибель — важный компонент, характеризующий развитие остеоартроза. Стимулирование апоптических процессов дексаметазоном, отмеченное в нашем исследовании, коррелирует с данными других авторов, показавших, что негативное воздействие на хрящ кортикостероидных гормонов, некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов осуществляется с активацией апоптоза [2]. Усиление апоптоза хондроцитов имеет место и при старении организма, что делает эти две ситуации достаточно схожими.

Воздействуя на процесс апоптоза, можно изменять ход событий при различных заболеваниях и тонко регулировать их течение [7]. Результаты указывают на значительную антиапоптогенную активность глюкозамина гидрохлорида в исследованной дозе. После лечения данной субстанцией животных с ОА подавляющая часть хондроцитов смогла вернуться в состояние нормальной жизнедеятельности, их морфологические признаки соответствовали интактным. С учетом значительной инертности хряща можно предположить, что единичные апоптические клетки, обнаруженные после лечения глюкозамина гидрохлоридом, еще до воздействия дексаметазона находились в готовности к апоптозу и представляли собой “слабое звено” ткани. При этом они отреагировали на первое же введение апоптогенного агента.

Парацетамол при симптоматической монотерапии ОА оказывает благоприятное действие на хрящевую ткань, частично подавляя индуцированный дексаметазоном апоптоз хондроцитов. Однако интенсивность апоптических процессов в суставном хряще в условиях применения парацетамола остается на достаточно высоком уровне, не позволяющем надеяться на быстрое восстановление хрящевой ткани. Это свидетельствует о том, что для оптимизации длительной терапии ОА парацетамол целесообразно комбинировать с так называемыми “медленно действующими симптом-модифицирующими препаратами”. На примере глюкозамина гидрохлорида показано, что последние способны эффективно подавлять процессы апоптоза хондроцитов и стимулировать восстановление матрикса дистрофически измененной хрящевой ткани. В данном случае это проявлялось, в частности, ростом количества изогенных групп хондроцитов, очевидно, для компенсации количества погибших клеток.

## ВЫВОДЫ

1. Моделирование системного стероидного остеоартроза путем хронической передозировки дексаметазона приводит к выраженному повышению доли апоптических хондроцитов в хрящевой ткани лабораторных животных.

2. Под воздействием глюкозамина гидрохлорида на протяжении 28 суток происходит значительное снижение апоптической активности хондроцитов в дистрофически измененном суставном хряще.

3. Лечение животных с экспериментальным остеоартрозом парацетамолом (20 мг/кг) на протяжении 28 суток приводит к снижению интенсивности процессов апоптоза хондроцитов.

4. При комбинированном применении глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом происходит усиление антиапоптической активности последнего в условиях экспериментального остеоартроза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. О. Туляков, *Клінічна фармація*, **14**(4), 50 – 53 (2010).
2. И. А. Зупанец, Н. А. Корж, Н. В. Дедух и др., *Методические рекомендации по экспериментальному исследованию и клиническому изучению противартрозных (хондромодулирующих) лекарственных средств (издание официальное)*, П. И. Серда (ред.), Издательство Украинской фармацевтической академии, Киев, Харьков (1999).
3. К. О. Зупанец, С. К. Шебеко, И. А. Отрішко, *Ліки України плюс*, № 3(12), 47 – 50 (2010).
4. О. Ю. Реброва, *Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA*, 3-е изд., МедиаСфера, Москва (2006).
5. С. В. Рыжов, В. В. Новиков, *Рос. биотерапевт. журн.*, **1**(3), 7 – 33 (2002).
6. *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation*, 4-е изд., Н. J. Rods (ред.), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim: (2008).
7. D. Vucic, W. J. Fairbrother, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 5995 – 6000 (2008).
8. S. P. J. Verkleij, P. A. J. Luijsterburg, B. W. Koes, et al., *BMC Musculoskeletal Disorders*, **11**, 7 – 14 (2010).
9. W. Zhang, M. Doherty, B. F. Leeb, et al., *Ann. Rheum. Dis.*, **66**, 377 – 388 (2007).
10. W. Zhang, G. Nuki, R. W. Moskowitz, et al., *Osteoarthritis Cartilage*, **18**, 476 – 499 (2010).

Поступила 18.10.11

## EFFECT OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE IN COMBINATION WITH PARACETAMOL ON CHONDROCYTE APOPTOSIS UNDER CONDITIONS OF SYSTEMIC STEROIDAL ARTHRITIS DEVELOPMENT IN RATS

I. A. Zupanets<sup>1</sup>, V. A. Tulyakov<sup>2</sup>, and S. K. Shebeko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kharkiv National Pharmaceutical University, ul. Pushkinskaya 53, 61002, Kharkiv, Ukraine;

<sup>2</sup> Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Pushkinskaya 80, 61024, Kharkiv, Ukraine

The effect of a combination of glucosamine hydrochloride with paracetamol on the apoptosis of chondrocytes in the articular cartilage of rats with experimental steroidal dystrophy (osteoarthritis) has been studied by histochemical methods. Untreated control rats are characterized by a significant increase in the fraction of chondrocytes involved in the processes of apoptosis. The treatment of animals by a combination of glucosamine hydrochloride with paracetamol substantially reduced the percentage of apoptic chondrocytes. The pronounced antiapoptic effect of the investigated combination differed but little from the effect of glucosamine hydrochloride alone, but significantly exceeded the antiapoptic activity of paracetamol.

**Key words:** Apoptosis, glucosamine hydrochloride, paracetamol, experimental osteoarthritis