УДК 576.367:617.72-007.17-547.564.4-092.9

І. А. Зупанець, В. О. Туляков, С. К. Шебеко

Національний фармацевтичний університет

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка АМН України»

ВПЛИВ ПАРАЦЕТАМОЛУ НА ПРОЦЕСИ АПОПТОЗУ ХОНДРОЦИТІВ В УМОВАХ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРОЗУ

Стаття присвячена гістохімічному вивченню впливу парацетамолу на процеси апоптозу хондроцитів у суглобовому хрящі щурів з експериментальною кортикостероїдною дистрофією. Відзначено, що дистрофічний процес у хрящовій тканині піддослідних тварин, ініційований введенням надмірно великих доз дексаметазону фосфату, характеризувався значним збільшенням частки хондроцитів, залучених до процесу апоптозу. Зроблено висновок про те, що механізм хондропротекторної активності парацетамолу в значній мірі пов'язаний з його антиапоптичною дією, що зберігає в цілості пул діючих метаболічно активних хондроцитів хрящової тканини синовіальних суглобів.

Ключові слова: апоптоз; парацетамол; остеоартроз; експеримент

ВСТУП

Вперше докази існування апоптозу (АП) були представлені в 1972 р. J. Kerr та ін. [8]. Встановлено, що в клітинах організму існує генетична програма, яка забезпечує визначений за часом життєвий цикл і за певних фізіологічних або патологічних умов включає програму загибелі клітин [2]. АП є загальним механізмом регульованої (запрограмованої) загибелі клітин у нормальних і патологічних процесах [1]. Головну роль у розвитку АП хондроцитів відводять сімейству білків Bcl–2 [10]. До регуляції АП залучені CD45 [7]. Епідермальний чинник зростання, навпаки, оберігає клітини хряща від залучення до процесу АП [11]. Кінцевою точкою розвитку процесу АП є руйнуванням мембран мітохондрій і утворення так званих гігантських пор [9]. У процесі розвитку АП відзначена регуляція шляхом розвитку зворотного зв'язку. Так, апоптичні клітини виживають шляхом вивільнення антиапоптичного агента сфінгозин–1–фосфату [6].

Під час переходу кількісних змін в якісні при дегенеративному процесі, зокрема при остеоартрозі (ОА), спостерігається активація АП [4]. Практичне застосування знань про АП у теперішній час стоїть на порядку денному в терапії ОА. Так, дистрофічні процеси в хрящі великих суглобів і міжхребцевих дисків супроводжуються активацією АП хондроцитів [12].

© *І. А. Зупанець, В. О. Туляков, С. К. Шебеко, 2011*

Оскільки як показано раніше, парацетамолу в низьких дозах притаманний помірний хондропротекторний ефект, можна припустити, що у взаємодії даного препарату з хрящовою тканиною можуть бути задіяні механізми регулювання АП. Зазначена особливість може бути важливою в рамках розробки нових хондропротекторних засобів.

Метою дослідження було визначення впливу парацетамолу на процеси апоптозу хондроцитів дистрофічного суглобового хряща.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В експерименті була використано 21 білого лабораторного щура-самця з масою тіла 190–210 г лінії Вістар популяції Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету, м. Харків, яких відбирали для досліджень і випадковим чином розподіляли по наступних групах по 7 тварин у кожній: 1) інтактні тварини; 2) контроль патології (модель ОА без лікування); 3) щури з моделлю ОА, яких згодом лікували парацетамолом.

Дослідження здійснювали на моделі кортикостероїдної дистрофії, викликаної внутрішньом'язовим введенням дексаметазону фосфату виробництва фірми «KRKA» (Словенія) в дозі 7 мг/кг 1 раз на тиждень впродовж 4-х тижнів [3]. Парацетамол виробництва фірми «Здоров'я трудящих» (Україна) в дозі 20 мг/кг вводили у вигляді водної суспензії в 1,0 мл фізіологічного розчину щодня внутрішньошлунково впродовж 28-ти діб. На

56-й день експерименту тварин виводили з досліду декапітацією під ефірним наркозом, після чого у них були забрані колінні суглоби.

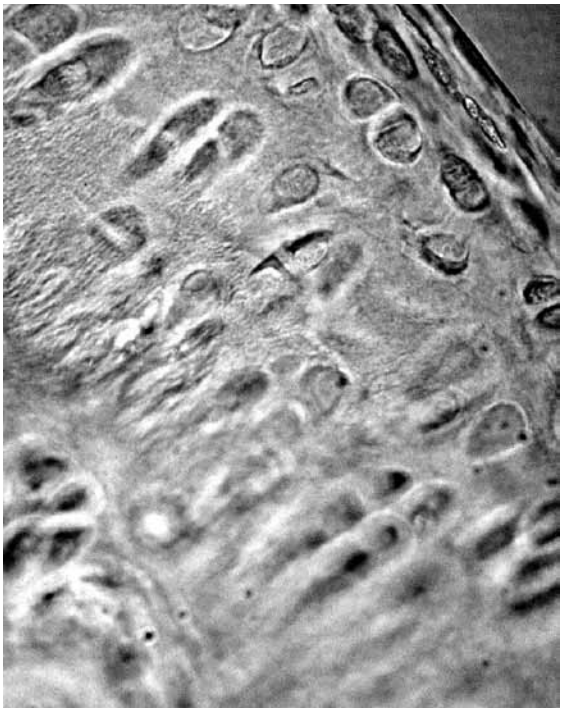
Колінні суглоби експериментальних щурів фіксували в 10 % нейтральному забуференому розчині формаліну, далі піддавали декальцинації в 10 % розчині трилону Б, дегідратації в спиртах зростаючої концентрації і заливали в парафін. Далі виготовляли зрізи, які монтували на предметне скло за допомогою розчину полі-L-лізину. Зрізи депарафінували і піддавали специфічному фарбуванню за допомогою наборів «In Situ Cell Death Detection Kit AP» (Cat. №.11 684 809 910) фірми «Roche» (Німеччина) для виявлення АП. Метод реєстрації ефекту TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick and labeling) заснований на міченні кінця ДНК флюоресцеїн-діуридинтрифосфатом (Ф-ДУТФ) з подальшим визначенням включеного флюоресцеїну з антитілами і візуалізацією антитіл [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

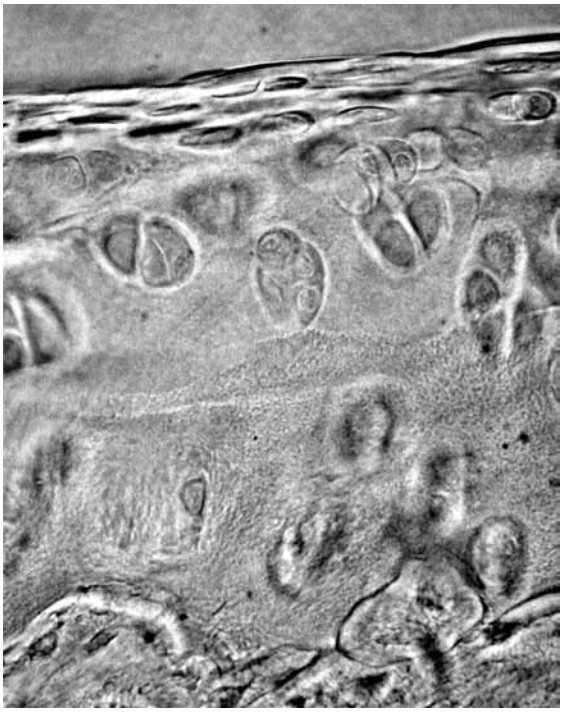
У ході роботи готували мікропрепарати з свідомо відсутнім і свідомо присутнім АП-міченням клітин (негативний і позитивний контроль відповідно). Клітини, що мали темне фарбування по периметру ядра в цитоплазмі, реєстрували як АП-позитивні. У негативному контролі подібні клітини були відсутні. В інтактних щурів рівень АП клітин суглобового хряща не перевищував 2 %. Основна частина хондроцитів відрізнялася позиційною специфічністю і класичною гістоархітектонікою (рис. 1 А, Б). Клітини на ранніх стадіях АП були присутні в одиничних кількостях і характеризувалися фарбуванням по периметру ядра (рис. 1 А). Клітини були з пікнотичними ядрами, фрагментами ядер, запустілі лакуни хондроцитів були відсутні.

Зіставлення рівня АП у інтактних тварин і у тварин з викликаною патологією доводить, що клітинна загибель є важливим фактором, що визначає розвиток остеоартрозу. Після хронічної дії дексаметазону від 50 % до 70 % хондроцитів знаходилися на тій або іншій стадії АП (рис. 2 А, Б).

Хоча TUNEL-позитивні клітини ідентифікувалися у всіх шарах хряща, переважна більшість з яких була локалізована в проміжному і глибокому шарах. Більшість клітин містила темно забарвлені ядра, по периметру яких чітко фарбувався фрагментований хроматин. У частині клітин фрагменти ДНК виявлялися в цитоплазмі у вигляді темних брилець ядерного хроматину. Спостерігалося порушення зональності розташування клітин суглобового хряща. Часто визначалися порожні лакуни. Іноді з 2-х клітин, що містяться в одній лакуні, одна піддавалася АП, інша виглядала нормальною. Можна

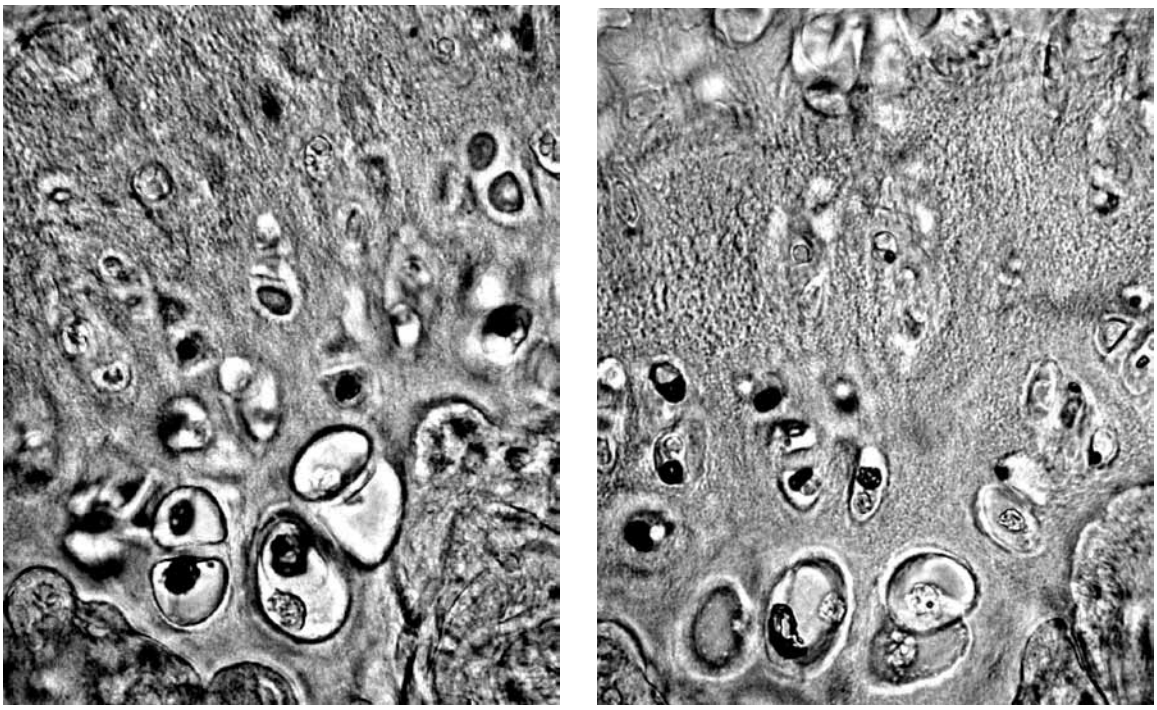


А)



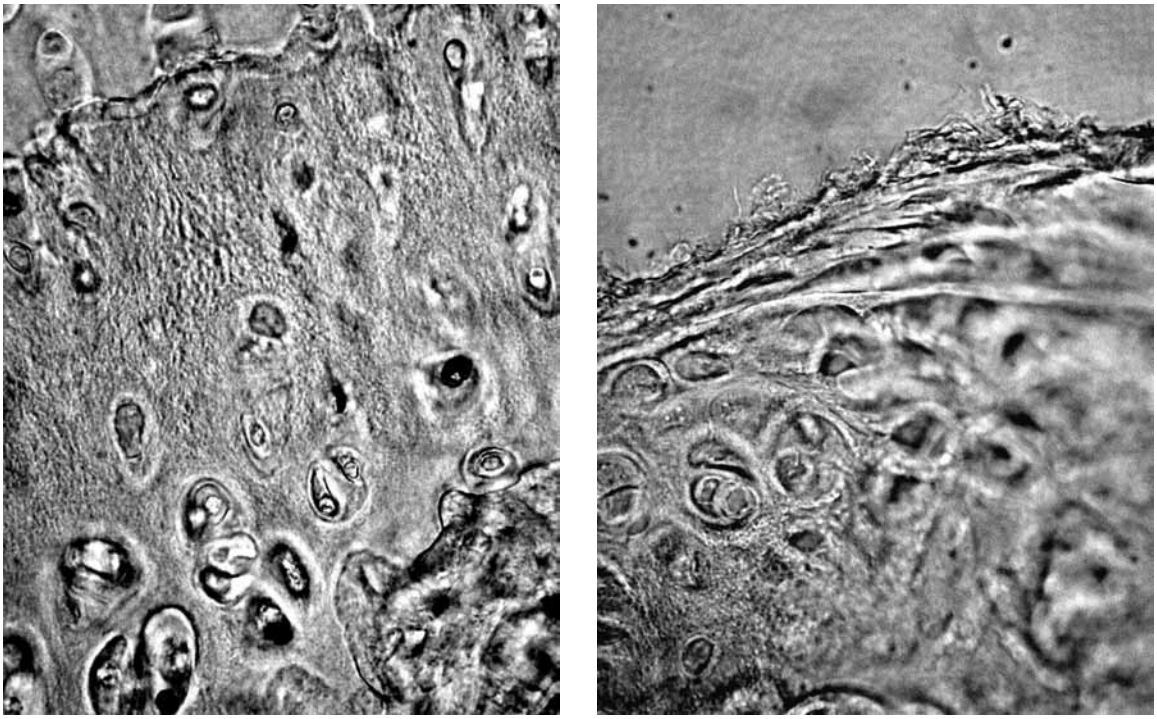
Б)

Рис. 1. *Хрящ колінного суглоба інтактних щурів: А); Б) відсутність апоптичного мічення. TUNEL-реакція. Зб. 250.*



А) *Б)*

Рис. 2. *Хрящ колінного суглоба контрольних щурів з кортикостероїдною дистрофією сполучної тканини: А) велика частина клітин з апоптичним міченням; утворення ізогенних груп клітин; Б) висока частота апоптичного мічення клітин; руйнування клітинної мембрани частини хондроцитів; утворення ізогенних груп клітин. TUNEL-реакція. Зб. 250.*



А) *Б)*

Рис. 3. *Хрящ колінного суглоба щурів з кортикостероїдною дистрофією сполучної тканини, лікованих парацетамолом: А) три випадки апоптичного мічення хондроцитів на різних стадіях процесу; рідкісне розташування хондроцитів; запустілі лакуни; Б) рідке апоптичне мічення хондроцитів на початкових стадіях процесу; висока щільність клітин хряща; збереження позиційної специфічності. TUNEL-реакція. Зб. 250.*

зробити висновок про те, що введення дексаметазону індукувало вступ клітин в АП. Розвиток кортикостероїдної дистрофії нагадував стан суглобового хряща у тварин старшої вікової групи. Тобто хронічне передозування дексаметазону викликало дегенеративні зміни хряща по типу прискореного старіння.

Лікування дослідних тварин парацетамолом у дозі 20 мг/кг призводило до сприятливих результатів. Кількість хондроцитів, що вступили в АП, знижувалося при цьому до 26,3 % (рис. 3 А, Б). Як правило, подібні клітини знаходилися на ранніх стадіях АП. У них фарбувалися цілісні незмінені ядра, хоча іноді в препаратах було видно залишки ДНК у цитоплазмі. При цьому гинули хондроцити як поверхневих, так і більш глибоких шарів суглобового хряща. Ступінь забарвлення ядер клітин, що вступили в АП, був помірним, менш вираженим, ніж у позитивному контролі, що свідчить про менше прогресування процесу дроблення ДНК. Спостерігалися запустілі лакуни хондроцитів, проте, в меншій кількості. Щільність хондроцитів була дещо зниженою в порівнянні з таким у інтактних тварин. На деяких мікропрепаратах спостерігалися невеликі безклітинні поля.

На підставі результатів експерименту можна стверджувати, що парацетамол в дослідженій дозі 20 мг/кг при симптоматичній монотерапії ОА чинив помірно сприятливу дію на хрящову тканину, частково пригнічуючи АП хондроцитів, індукований дексаметазоном. Проте частка АП хондроцитів дистрофічного хряща в умовах застосування парацетамолу також залишалася на достатньо високому рівні, що не дозволяє сподіватися на швидке відновлення хрящової тканини навіть при припиненні негативної зовнішньої дії. Це свідчить про те, що для отримання кращих результатів при тривалій терапії ОА парацетамол бажано комбінувати з так званими «повільно діючими симптоматичними препаратами», здатними ефективно пригнічувати процеси АП і стимулювати відновлення матриксу дистрофічної хрящової тканини.

ВИСНОВКИ

1. Моделювання кортикостероїдної дистрофії шляхом хронічного передозування дексаметазону призводило до вираженого збільшення частки апоптичних хондроцитів у хрящі колінних суглобів піддослідних щурів.
2. Парацетамол у дозі 20 мг/кг при щоденному внутрішньошлунковому введенні показав помірний антиапоптичний ефект, який проявлявся у нейтралізації приблизно половини випадків апоптозу хондроцитів на тлі дегенеративно-дистрофічного ураження суглобів, що дозволяє розглядати даний засіб як хондропозитивний.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Егорова И.Ф. Апоптоз и некроз: взаимоотношение явлений / И.Ф. Егорова, Р.А. Серов // Морфол. — 2004. — Т. 126, № 4. — С. 71-75.
2. Клубова А.Ф. Апоптоз и остеопороз / А.Ф. Клубова, Т.И. Гавриленко, А.И. Дейкун, В.Н. Залесский // Укр. ревматол. журн. — 2000. — № 1. — С. 19-22.
3. Методические рекомендации по экспериментальному исследованию и клиническому изучению противоартрозных (хондромодулирующих) лекарственных средств (издание официальное) / [И.А. Зупанец, Н.А. Корж, Н.В. Дедух и др.]; под ред. д-ра мед. наук, проф. П.И. Середы. — К.-Х.: Изд-во Укр. фарм. академии. — 1999. — 56 с.
4. Apoptosis, Cytotoxity and Cell Proliferation / Ed. H.J. Rods. — Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 2008. — 180 p.
5. Kerr J.F.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics / J.F.R. Kerr, A.H. Wylie, A.R. Currie // Brit. J. Cancer. — 1972. — Vol. 26, № 4. — P. 239-257.
6. Kroemer G. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // Physiol. Rev. — 2007. — Vol. 87. — P. 99-163.
7. Liu Z. CD45 regulates apoptosis in peripheral T lymphocytes / [Z. Liu, R. Dawes, S. Petrova et al.] // Int. Immunol. — 2006. — Vol. 18. — P. 959-966.
8. Oshima Y. Pivotal Role of Bcl-2 Family Proteins in the Regulation of Chondrocyte Apoptosis / [Y. Oshima, T. Akiyama, A. Hikita et al.] // J. Biol. Chem. — 2008. — Vol. 283. — P. 26499-26508.
9. Sastry K.S.R. Epidermal Growth Factor Protects Prostate Cancer Cells from Apoptosis by Inducing BAD Phosphorylation via Redundant Signaling Pathways / K.S.R. Sastry, Y. Karpova, G. Kulik// J. Biol. Chem. — 2006. — Vol. 281. — P. 27367-27377.
10. Sharma A.K. Activation of apoptotic processes during transition from hypertrophy to heart failure in guinea pigs / A.K. Sharma, S. Dhingra, N. Khaper, P.K. Singal // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2007. — Vol. 293. — P. 1384-1390.

11. Simkin P.A. A biography of the chondrocyte / P.A. Simkin // Ann. Rheum. Dis. — 2008. — Vol. 67, № 8. — P. 1064-1068.
12. Weigert A.M. Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate / [A.M. Weigert, A. Johann, A. von Knethen et al.] // Blood. — 2006. — Vol. 108. — P. 1635-1642.

УДК 576.367:617.72-007.17-547.564.4-092.9

И.А. Зупанец, В.А. Туляков, С.К. Шебеко

ВЛИЯНИЕ ПАРАЦЕТАМОЛА НА ПРОЦЕССЫ АПОПТОЗА ХОНДРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОАРТРОЗА

Статья посвящена гистохимическому изучению влияния парацетамола на процессы апоптоза хондроцитов в суставном хряще крыс с экспериментальной кортикостероидной дистрофией. Отмечено, что дистрофический процесс в хрящевой ткани подопытных животных, инициированный введением избыточно больших доз дексаметазона фосфата, характеризовался значительным увеличением доли хондроцитов, вовлеченных в процесс апоптоза.

Сделан вывод о том, что механизм хондропротекторной активности парацетамола в значительной степени связан с его антиапоптическим действием, сохраняющим в целости пул действующих метаболически активных хондроцитов хрящевой ткани синовиальных суставов.

Ключевые слова: апоптоз; парацетамол; остеоартроз; эксперимент

UDC 576.367:617.72-007.17-547.564.4-092.9

I.A. Zupanets, V.A. Tulyakov, S.K. Shebeko

INFLUENCE OF PARACETAMOL ON APOPTOSIS PROCESSES OF CHONDROCYTES IN THE CONDITIONS OF THE EXPERIMENTAL OSTEOARTHROSIS DEVELOPMENT

The article is devoted to the hystochemical study of influencing of paracetamol on the processes of apoptosis of chondrocytes in the articular cartilage of rats with experimental steroidal dystrophy. It is marked that the dystrophy process in cartilaginous tissue of experimental animals, initiated by introduction surplus large doses of dexametazone phosphate, was characterized by the considerable increase of stake of the chondrocytes engaged in the process of apoptosis.

The conclusion has been done that the mechanism of chondroprotective activity of paracetamol is largely related to his antiapoptic action saving in safety pool of active chondrocytes of cartilaginous fabric of synovial joints operating metabolically.

Key words: apoptosis; paracetamol; osteoarthrosis; experiment

Адреса для листування:
61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 27.
Кафедра клінічної фармації з фармацевтичною опікою
Тел. (057) 706-30-67

Надійшла до редакції:
18.04.2011