

УДК 616.728.3-002:616.71-018.3]-08

## Ультраструктура суглобового хряща щурів з експериментальним гонартрозом в умовах впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання, диклофенаку та глюкозаміну

Л.М. Бенгус, К.В. Маколінець, В.Є. Мальцева, Н.Ю. Шкодовська

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України», Харків

*The influence of different combinations of low-intensity infrared laser radiation, Diclofenac and Glucosamine on the ultrastructural organization of an articular cartilage of rats with experimental osteoarthritis was studied with help of methods of transmission electronic microscopy. It was found out that glucocorticoid-induced osteoarthritis was accompanied by considerable damages in the ultrastructural organization of the articular cartilage. Chondrocytes revealed heterochromatization of the cell nucleus, areas of destruction in cytoplasm, fragmentation and degranulation of endoplasmic reticulum, and an increased amount of lysosomes in cytoplasm. Conservative treatment of the animals with experimental osteoarthritis by the laser-Glucosamine-Diclofenac complex promoted activation of chondrocyte metabolism and enhancement of biosynthetic processes in chondrocytes.*

*Методами трансмісійної електронної мікроскопії досліджено вплив різних комбінацій низькоінтенсивного інфрачервоного лазерного випромінювання, диклофенаку та глюкозаміну на ультраструктурну організацію суглобового хряща щурів з експериментальним гонартрозом. Установлено, що глюкокортикоїд-індукований гонартроз супроводжується значними порушеннями ультраструктурної організації суглобового хряща. В хондроцитах відзначено гетерохроматизація ядерного ядра, очаги деструкції цитоплазми, фрагментація та дегрануляція ендоплазматичної мережі, підвищене вміщення лізосом в цитоплазмі. Консервативне лікування тварин з експериментальним гонартрозом комплексом «лазер – глюкозамін – диклофенак» сприяє активізації метаболізму хондроцитів суглобового хряща та посиленню в них біосинтетичних процесів.*

**Ключові слова:** гонартроз, суглобовий хрящ, хондроцити, інфрачервоне лазерне випромінювання, диклофенак, глюкозамін

На сьогодні гонартроз (ГА) — це «гетерогенна група захворювань різної етіології, але з подібними біологічними, морфологічними та клінічними результатами, за яких у патологічний процес залучається не тільки суглобовий хрящ, але й усі структури суглоба — субхондральна кістка, зв'язки, суглобова капсула, синовіальна мембрана та періартикулярні м'язи» [1, 2], що зрештою призводить до деформації суглобів та порушення їх функцій. Для лікування гонартрозу існує широкий арсенал медикаментозних препаратів, серед яких особливе місце посідають нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП). Вони швидко пригнічують запалення, яке спостерігають у разі більшості ревматичних за-

хворювань, зокрема ГА, сприяють зменшенню або навіть ліквідації основних проявів захворювання. Внаслідок спрямованості на патологічний процес, швидкого ефекту і відсутності феномену звикання НПЗП посідають одне з центральних місць у терапії ревматологічних захворювань [3]. Одним із препаратів групи НПЗП, який найбільш розповсюджений у сучасній медицині, є диклофенак натрію, визнаний за «золотий стандарт» терапії ревматологічних захворювань. Диклофенак натрію має виражену протизапальну та анальгетичну активність.

Останніми роками важливе місце в терапії ГА займають так звані симптоматичні препарати уповільненої дії зі структурно-модифікувальними

властивостями [4]. Одним з них є глюкозамін, який стимулює біосинтез глікозаміногліканів, що лежить в основі його хондропротекторної дії. Глюкозамін і його похідні мають виражену протиартрозу, протизапальну, протиекседативну, анальгетичну, антигіпоксичну, антипротеолітичну та анаболічну дію.

Низькоінтенсивне лазерне випромінювання (НЛВ) відіграє важливу роль у клінічній практиці відновного лікування хворих на остеоартроз [5]. Вивчення різних підходів до використання НПЗП, структурно-модифікувальних препаратів у комплексі з фізіотерапевтичними чинниками в лікуванні остеоартрозу є актуальним завданням сучасної медицини та фармації.

*Мета роботи* — вивчити вплив різних комбінацій низькоінтенсивного інфрачервоного лазерного випромінювання, диклофенаку натрію та глюкозаміну гідрохлориду на ультраструктуру організації суглобового хряща щурів з експериментальним остеоартрозом.

## Матеріал та методи

Роботу виконано на 10 білих щурах (самицях) 3-місячного віку популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України». Остеоартроз моделювали шляхом внутрішньом'язового введення дексаметазону (7 мг/кг, один раз на тиждень, впродовж трьох тижнів) у периакулярні тканини в ділянці колінного суглоба. Лікування розпочинали через три доби після останньої ін'єкції дексаметазону, режим проведення лікувальних сеансів — щоденно впродовж 10 діб. Диклофенак натрію (8 мг/кг) та глюкозаміна гідрохлорид (50 мг/кг) щурам вводили *per os*.

У тварин двох дослідних груп опромінення НЛВ здійснювали щоденно через 15 хв після або за 15 хв до вживання препаратів. НЛВ було застосовано у дозі 0,3 Дж. Контактне опромінювали звільнену від шерсті задню поверхню правого колінного суглоба щура за допомогою апарата «Мустанг»: довжина хвилі 0,89 мкм, імпульсна потужність 7–8 Вт, імпульсна частота 3000 Гц, тривалість сеансу 3 хв 42 с.

Евтаназію тварин з ОА здійснювали через 21 та 34 доби після початку експерименту, пролікованих щурів з ОА — через 10 діб після початку лікування (34 доби після початку експерименту).

Дослідження вміщувало 5 серій експерименту (по два щури у кожній серії): перша серія — щури з експериментальним ОА; друга — щури з експериментальним ОА без лікування (після відновлювального періоду); третя — щури з ОА, яких лікували диклофенаком та глюкозаміном; четверта — щури

з ОА, яких лікували диклофенаком та глюкозаміном з подальшим застосуванням НЛВ; п'ята — щури з ОА, опромінені НЛВ, з подальшим застосуванням диклофенаку і глюкозаміну. У роботі з тваринами дотримувались основних міжнародних нормативів з біоетики [6].

Для електронно-мікроскопічних досліджень фрагменти суглобового хряща (розміром 1 мм<sup>3</sup>) виростків стегнової кістки колінного суглоба білих щурів префіксували у 5% розчині глутаральдегіду з подальшою постфіксацією 1% розчином чотирьохокису осмію. Матеріал дегідрували в серії спиртів висхідної концентрації та ацетоні, заливали у суміш епоксидних смол «епон-аралдит» [7]. Ультратонкі зрізи (товщиною 40–60 нм) виготовляли на ультрамікротомі УМТП-3М, контрастували за Reynolds [8] та досліджували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу ЕМВ-100 БР. Фотовідбитки негативів електроннограм виготовляли за допомогою цифрової фотокамери Canon EOS-300 D.

Для оцінювання ефективності запропонованих схем консервативного лікування порівнювали групи тварин з використанням впливів із групами щурів з експериментальним ОА без лікування (після відновлювального періоду).

## Результати та їх обговорення

*Щури з експериментальним остеоартрозом.* Електронно-мікроскопічний аналіз показав, що у тварин цієї серії експерименту поверхня суглобового хряща на ділянках мала нерівний контур, заглибини та осередки розволокнення колагенового каркасу, при цьому колагенові волокна розташовувалися нещільно і хаотично (рис. 1). У поверхневій зоні були локалізовані хондроцити подовженої форми з осередками деструкції цитоплазми. На ділянках цитоплазми спостерігали фрагментацію каналців агранулярної ендоплазматичної сітки (аЕПС).

У хондроцитах проміжної зони були наявні гетерохроматизовані ядра та спостерігалось порушення цілісності ядерної мембрани. У цитоплазмі визначали осередки деструкції (рис. 2). Мала місце фрагментація каналців гранулярної ендоплазматичної сітки (гЕПС) (рис. 2), у цитоплазмі була значна кількість вільних рибосом, що вказувало на можливість їх вивільнення шляхом дегрануляції мембран ЕПС.

Виявляли деструкцію мітохондрій, які були дрібних розмірів з високою електронною щільністю та практично повною відсутністю крист. Цитоплазма окремих хондроцитів характеризувалася підвищеним вмістом лізосом, мікротрубочок та мікрофіламентів. Поява таких клітин, імовірно, свідчить про зміну характеру метаболізму хондроцитів, які



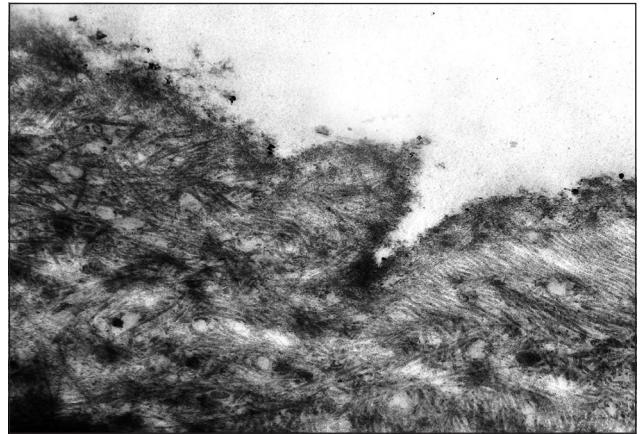
в умовах прогресування деструкції активізують свій лізосомальний апарат для розщеплення продуктів катаболізму та цитоскелет — для їх вивільнення. Частина (20%) хондроцитів практично не мали порушень ультраструктурної організації або вони були незначними.

*Щури з експериментальним остеоартрозом без лікування (після відновлювального періоду).* Аналіз ультраструктурної організації суглобового хряща тварин цієї серії експерименту показав, що у поверхневій зоні розташовувалися хондроцити подовженої та еліпсоподібної форми, які переважно не формували лакун. У значній частині хондроцитів визначали осередки деструкції ядра, а порушення цитоплазми проявлялося набуханням та везикуляцією гЕПС, наявністю численних залишкових тілець. У поверхневій та проміжній зонах спостерігали осередкову кальцифікацію територіального та інтертериторіального матриксу, що супроводжувалося його високою електронною щільністю. При цьому фронт осифікації був нерівномірний.

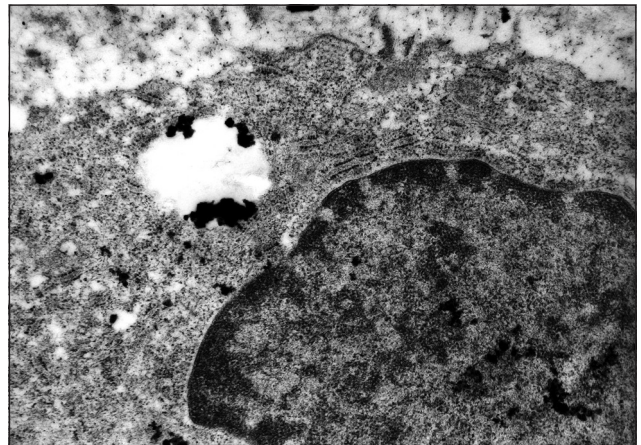
У проміжній зоні переважали хондроцити, які формували хрящові лакун (переважно по 2 клітини у лакуні). Цитоплазма у таких хондроцитів часто містила осередки деструкції. В окремих хондроцитах спостерігали набряк цитоплазми, при цьому у перинуклеарній зоні визначали великі за розмірами вакуолі (рис. 3), заповнені набряковою рідиною, що характерно для гідропічної дистрофії.

В цілому, у суглобовому хрящі щурів зі змодельованим ОА після двох тижнів відновлювального періоду зберігалися значні ознаки деструкції хондроцитів (набрякові порожнини у цитоплазмі, осередковий лізис каріолеми, везикуляція гЕПС, залишкові тільця). Більшість хондроцитів (70%) суглобового хряща містила деструктивні зміни різного прояву та інтенсивності; 30% клітин мали незначні порушення ультраструктурної організації, яка майже відповідала нормі.

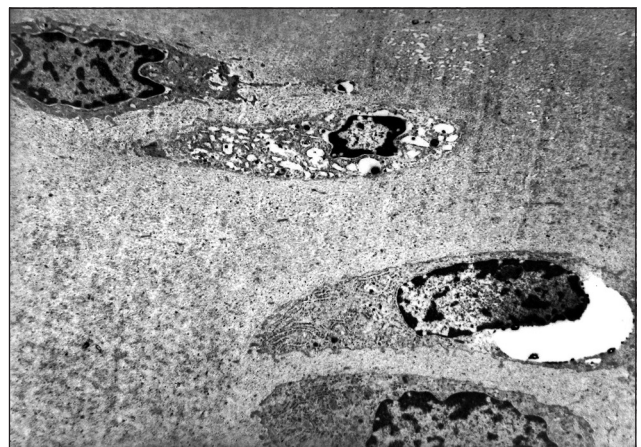
*Лікування диклофенаком та глюкозаміном.* Електронно-мікроскопічні дослідження суглобового хряща тварин показали заглибини та тріщини у поверхневій зоні, розшарування колагенового матриксу на значному просторі та низьку щільність хондроцитів. У проміжній зоні визначали хондроцити з ядром, представленим гетеро- та еухроматином, і цитоплазмою з нечисленними каналцями гЕПС. Клітини мали велику кількість відростків, що відображає їх комунікативні можливості. Траплялися як ізольовані хондроцити, так і розташовані в ізогенних групах, переважно по 2 клітини у групі. Такі хондроцити містили в цитоплазмі каналці аЕПС, секреторні пухирці та залишкові тільця. У 40%



**Рис. 1.** Електроннограма. Суглобовий хрящ щура з експериментальним остеоартрозом. Поверхня зона суглобового хряща. Нерівність суглобової поверхні та заглибини на ній. Неупорядкованість розташування колагенових волокон. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 16800

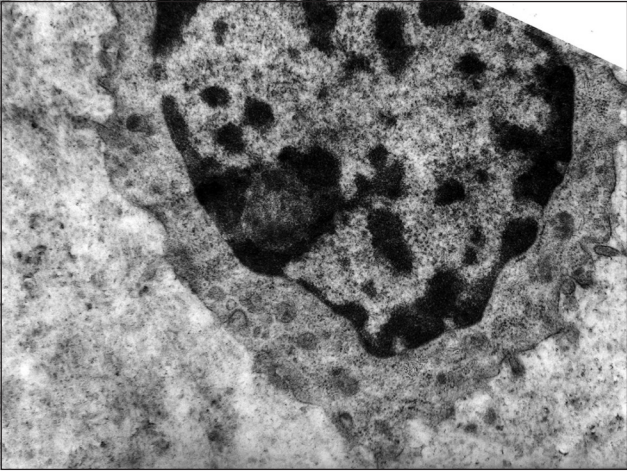


**Рис. 2.** Електроннограма. Суглобовий хрящ щура з експериментальним остеоартрозом. Фрагмент хондроцита проміжної зони. Осередки деструкції цитоплазми. Фрагментація каналцїв гранулярної ЕПС. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 15600

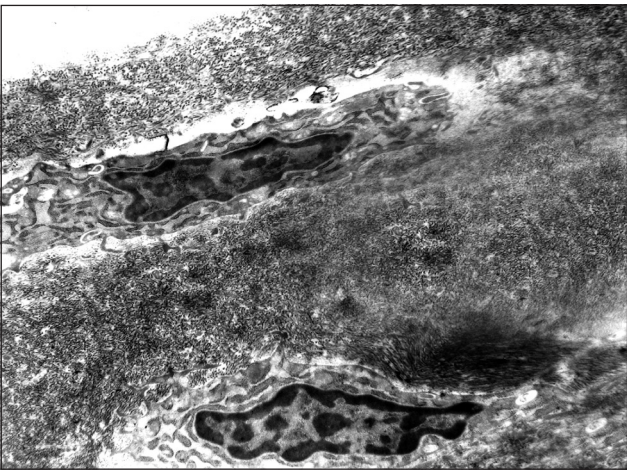


**Рис. 3.** Електроннограма. Суглобовий хрящ щура з експериментальним остеоартрозом без лікування (після відновлювального періоду). Хондроцити проміжної зони. Варіабельні за розмірами осередки деструкції цитоплазми. Велика вакуоль на межі ядра та цитоплазми. Везикуляція гЕПС. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 4000





**Рис. 4.** Електронограма. Лікування диклофенаком, глюкозаміном із подальшим застосуванням НІЛВ. Фрагмент хондроцита проміжної зони з великим ядром та периферично локалізованим ядерцем. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 10000



**Рис. 5.** Електронограма. Опромінення НІЛВ із подальшим застосуванням диклофенаку і глюкозаміну. Два функціонально активних хондроцита поверхневої зони із численними каналцями гранулярної та агранулярної ЕПС, секреторними пухирцями комплексу Гольджі. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 6000

хондроцитів суглобового хряща шурів цієї експериментальної групи ультраструктурна організація була типовою для інтактних тварин.

*Лікування диклофенаком, глюкозаміном із подальшим застосуванням НІЛВ.* Поверхня суглобового хряща на ділянках мала заглибини та розшарування колагенових волокон. У поверхневій зоні розташовані хондроцити подовженої форми, цитоплазма яких містила розвинену гранулярну та агранулярну ЕПС. Однак у цитоплазмі хондроцитів визначалися осередки деструкції каналців ЕПС з ознаками гомогенізації.

У проміжній зоні були представлені хондроцити типової форми та розмірів, які нерідко містили ядро з численними інвагінаціями каріолеми та цитоплазми з переважанням гранулярної або агранулярної

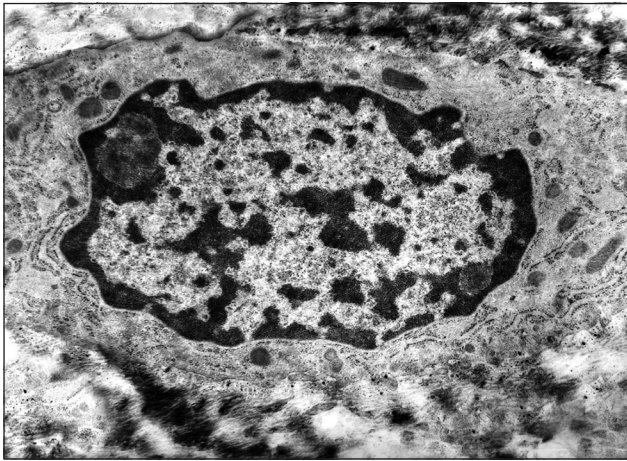
ЕПС. Однак на значних ділянках у цих клітинах контури цитоплазматичної та ядерної мембран були нечіткими, що відображує наявність осередків їх лізису. У клітинах з переважанням аЕПС інколи визначався комплекс Гольджі у вигляді окремих сплюснених мішечків та невеликих пухирців. Зрідка на межі поверхневої та проміжної зон виявляли поодинокі клітини з великим ядром та ядерцем (рис. 4), що свідчить про активізацію біосинтезу білкових макромолекул. В цілому, у тварин цієї серії експерименту 48% хондроцитів суглобового хряща мали характерну для норми ультраструктуру.

Під час порівняння результатів цієї серії експерименту з попередніми (неліковані тварини та після впливу лише фармпрепаратів) виявлено, що лікування медикаментозними препаратами з подальшим застосуванням лазера сприяло незначній активізації метаболічних процесів хондроцитів поверхневої та проміжної зон суглобового хряща.

*Опромінення НІЛВ із подальшим застосуванням диклофенаку і глюкозаміну.* Товщина суглобового хряща на виростках стегнової кістки була рівномірною. У поверхневій зоні розташовувалися хондроцити подовженої форми з подовженим ядром (рис. 5), представленим еу- і гетерохроматином приблизно у рівному співвідношенні. Цитоплазма таких хондроцитів містила значну кількість каналців аЕПС, заповнених аморфним матеріалом помірної електронної щільності, що вказує на активізацію біосинтетичних процесів. Подекуди каналці розширювалися у цистерни з накопиченими продуктами метаболізму. Окремі каналці локалізувалися поблизу цитоплазматичної мембрани або безпосередньо контактували з нею, що свідчить про вивільнення продуктів біосинтезу у перичелюлярний простір.

У проміжній зоні розташовувалися ізогенні групи хондроцитів (2–4 клітини). Такі хондроцити мали значні розміри, містили велике ядро, представлене переважно еухроматином. У ядрі хондроцитів нерідко визначали досить велике електроннощільне ядерце (рис. 6). Канальці гЕПС у вигляді паралельно орієнтованих профілів розташовувалися на значній території цитоплазми. Суглобовий хрящ тварин цієї експериментальної групи містив 52% хондроцитів з характерною для норми ультраструктурною організацією.

Слід відзначити, що у проміжній зоні суглобового хряща тварин цієї серії експерименту зрідка траплялися хондроцити, що містили два ядра та численні каналці гЕПС. Можна припустити, що під впливом лазерного випромінювання з подальшим застосуванням комплексу фармпрепаратів на



**Рис. 6.** Електронограма. Опромінення НІЛВ із подальшим застосуванням диклофенаку і глюкозаміну. Хондроцит проміжної зони з великим функціонально активним ядром та великим периферично розташованим ядерцем. Канальці гЕПС у цитоплазмі. Контрастування за Рейнольдсом. Зб. 8000

межі поверхневої та проміжної зон суглобового хряща активізуються процеси аміотичного поділу хондроцитів, що є відображенням компенсаторних механізмів хрящової тканини у відповідь на глибокі порушення ультраструктури клітин в умовах впливу глюкокортикоїдів. На можливість поділу хондроцитів шляхом амітозу вказувала у своїй монографії ще В.Н. Павлова зі співавт. [9].

Частина хондроцитів містила осередки деструкції цитоплазми. Нерідко у цитоплазмі хондроцитів проміжної зони виявлялася значна кількість вторинних лізосом, що вказує на активізацію процесів розщеплення продуктів дегенерації як цитоплазми, так і хрящового матриксу.

Отже, під впливом лазерного опромінення та внаслідок подальшої дії застосованих фармпрепаратів (глюкозаміну гідрохлориду та диклофенаку натрію) у хондроцитах поверхневої та проміжної зон суглобового хряща відзначали активізацію метаболізму, що супроводжувалося підсиленням у них біосинтетичних процесів. Однак зберігалися дегенеративні зміни хрящової тканин, які було викликано впливом дексаметазону. Певно, що на цей термін спостереження застосований нами комплексний підхід до лікування остеоартрозу не здатний усунути всі ті

негативні зміни, що розвинулись у суглобовому хрящі експериментальних тварин. Але відзначена нами тенденція до відновлення структури суглобового хряща свідчить про ефективність застосування НІЛВ у комплексному лікуванні остеоартрозу.

## Висновки

1. Глюкокортикоїд-індукований експериментальний остеоартроз у щурів супроводжується значними порушеннями ультраструктурної організації суглобового хряща. У хондроцитах визначаються гетерохроматизація ядра, осередки деструкції цитоплазми, фрагментація та дегрануляція ендоплазматичної сітки, підвищення вмісту лізосом у цитоплазмі.

2. За умов використання у консервативному лікуванні тварин з експериментальним остеоартрозом комплексу «лазер – глюкозамін – диклофенак» встановлено, що ця комбінація сприяє активізації метаболізму хондроцитів суглобового хряща та підсиленню в них біосинтетичних процесів.

## Література

1. Kuetter K.E. Osteoarthritic disorders / K.E. Kuetter, V.M. Goldberg // American academy of orthopedic surgeon, Rosemont, 1995. — P. 21–25.
2. Сустав: морфология, клиника, диагностика, лечение / В.Н. Павлова, Г.Г. Павлов, Н.А. Шостак, Л.И. Слуцкий. — Медицинское информационное агентство, 2011. — 552 с.
3. Остеоартроз. Консервативная терапия / Н.А. Корж, А.Н. Хвисьок, Н.В. Дедух и др. — Харьков: Золотые страницы, 2007. — 424 с.
4. 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. — Киев–Харьков: Изд-во Украинской фармацевтической академии. — 1999. — 56 с.
5. Богатырева Т.В. Механизм ростостимулирующего действия лазерного излучения на хрящевую ткань у больных остеоартрозом / Т.В. Богатырева: Материалы межд. конф. «Лазер и здоровье 99». — М., 1999. — С. 262.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. — Strasbourg, 1986. — P. 52.
7. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. — М.: «Мир», 1975. — 324 с.
8. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH an electronopaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds. // J. Cell Biol. — 1963. — Vol. 17. — P. 208–212.
9. Хрящ / В.Н. Павлова, Т.Н. Копьева, Л.И. Слуцкий, Г.Г. Павлов. — М.: Медицина, 1988. — 317 с.