

© Пішак О.В.

УДК 616.71-007.24-085.355:611-018.3

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ХРЯЩА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ОСТЕОАРТРОЗІ ЗА СИСТЕМНОЇ ЕНЗИМОТЕРАПІЇ

О.В.Пішак

Кафедра пропедевтики внутрішніх хвороб (зав. – проф. О.І.Волошин) Буковинської державної медичної академії

Проблема лікування остеоартрозу (ОА) набуває все більшого значення, оскільки в загальній структурі захворюваності та інвалідизації ОА посідає одне з провідних місць і навіть за адекватної терапії піддається хронізації. Медико-соціальна значущість, складність патогенезу, прогресуючий, рецидивний перебіг визначають необхідність пошуку більш ефективних способів лікування ОА.

Новітні досягнення в галузі імунології дозволили встановити роль прозапальних цитокінів у патогенезі ревматичних захворювань. У ранньому періоді ОА потовщення, підсилення васкуляризації та інфільтрація лейкоцитами синовіальної оболонки суглобів настають за підвищення тканинного вмісту інтерлейкіну-1 β (ІЛ-1 β) і фактора некрозу пухлин α (ФНП α) та зниження рівня рецепторного антагоніста ІЛ-1 [1, 2]. Хондроцити хворих на ОА містять велику кількість ФНП α та ІЛ-1 β [3, 4]. Останній індукує генерацію кисневих радикалів та пригнічує синтез протеогліканів [5], що асоціюється з деструкцією хряща [6]. Стимуляція вивільнення колагену з хрящової тканини онкостатином М за його взаємодії з ІЛ-1 β призводить до зруйнування хряща [7], тоді як трансформувальний фактор росту- β_1 (ТФР- β_1), навпаки, стимулює хондрогенез [8, 9]. Рівновага між цитокінами і факторами росту визначає інтенсивність синтезу і дегградації хрящового екстрацелюлярного матриксу, що відкриває перспективи пошуку лікарських засобів, які здатні впливати на авто- і паракринну регуляцію метаболізму сполучної тканини [10].

Сучасна комплексна протиревматична терапія спрямована на основні патогенетичні механізми ревматичних захворювань,

зокрема на запальні та імунні реакції [11]. Однак існуючі засоби лише у деякій мірі відповідають необхідним вимогам, оскільки недостатньо ефективні і мають багато побічних ефектів. Системна ензимотерапія (СЕТ) є альтернативною в лікуванні ревматичних захворювань. Ензимні препарати не тільки характеризуються протизапальною, імуномодулювальною і вторинною анальгезуючою дією, але й впливають безпосередньо на патогенетичні фактори [12]. Однією з основних властивостей СЕТ є її вплив на ексудативне запалення та участь у модифікації імунної відповіді. Це забезпечило впровадження СЕТ у лікуванні захворювань, в основі патогенезу яких лежить запалення, набряк, імунні зрушення [13, 14].

Проте зазначені дані відбивають переважно перебіг основних патогенетичних процесів на організмовому рівні, в той час, як більшість реакцій, що ведуть до дегградації сполучної тканини, є локальними. В світовій літературі практично відсутні дані щодо характеру та реалізації впливу поліензимних препаратів за ОА на морфологічному рівні, включаючи співвідношення активності процесів деструкції/репарації та основні прояви місцевої запальної реакції.

Мета дослідження. З'ясувати механізми впливу СЕТ на перебіг запалення у суглобах при експериментальному остеоартрозі (ЕОА) для оптимізації схем лікування ОА у людини.

Матеріал і методи. Робота виконана на 100 скакальних суглобах статевозрілих білих щурів. Для досягнення мети застосовано схему експерименту (таблиця), адаптовану до етапів розвитку ураження суглобів при ЕОА.

Для верифікації і розвитку патологічного процесу в суглобах проведено гістологічне дослідження.

Схема експерименту

Доба п/п	ОСТЕОАРТРОЗ		
	Серія А	Серія В	Серія К
1	ПАПАІН	ПАПАІН	0,9% NaCl в/о
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	ПАПАІН	ПАПАІН	0,9% NaCl в/о
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	ПАПАІН + ФЛОГЕНЗИМ	ПАПАІН + 0,9% NaCl в/ш	0,9% NaCl в/о
10	ФЛОГЕНЗИМ	0,9% NaCl в/ш	0,9% NaCl в/ш
11	ФЛОГЕНЗИМ	0,9% NaCl в/ш	0,9% NaCl в/ш
12	ФЛОГЕНЗИМ	0,9% NaCl в/ш	0,9% NaCl в/ш
13	ПАПАІН + ФЛОГЕНЗИМ	ПАПАІН + 0,9% NaCl в/ш	0,9% NaCl в/о
14	ФЛОГЕНЗИМ	0,9% NaCl в/ш	0,9% NaCl в/ш
15	ФЛОГЕНЗИМ	0,9% NaCl в/ш	0,9% NaCl в/ш
16	ФЛОГЕНЗИМ	0,9% NaCl в/ш	0,9% NaCl в/ш
17	ЕВТАНАЗІЯ	ЕВТАНАЗІЯ	ЕВТАНАЗІЯ

Примітки: в/о – внутрішньоочервинно; в/ш – внутрішньошлунково.

Аналіз ефективності СЕТ базувався на визначенні впливу флогензиму на основні патогенетичні механізми ушкодження синовіальної оболонки і хрящової тканини суглобів при ОА: інтенсивність генерації активних форм кисню (АФК) і процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), активність ферментів протирадикального захисту дієнових кон'югат (ДК), малонового альдегіду (МА), глутатіонпероксидази (ГПО), супероксиддисмутази (СОД), інтенсивність протеолітичної деструкції низькомолекулярних (НБ) і високомолекулярних білків (ВБ) та колагену, інтенсивність тканинного фібринолізу, цитокінова регуляція запального процесу в уражених суглобах.

Отримані результати оброблено методом варіаційної статистики з використанням програми BioStat.

Результати дослідження та їх обговорення. У щурів з ЕОА інтенсивність хемілюмінесценції (ХМЛ), індукованої гомогенатами синовіально-хрящового комплексу (СХК) тканин уражених запальним процесом суглобів, у 2,8 раза перевищувала контрольні величини, що супроводжувалося збільшенням вмісту в них ДК і МА.

Водночас спостерігалось суттєве пригнічення ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ): активність СОД зменшувалася відносно контролю в 2,1 раза, каталази – на 36,4%, ГПО – на 36,3%. Рівень нейтральних

та основних альдегідо- і кетонпохідних пероксидно модифікованих білків (ПМБ) у СХК тканин уражених суглобів зростав відповідно в 4,6 та 5,1 раза.

Таким чином, при ЕОА у синовіальній оболонці та хрящі суглобів підвищення інтенсивності генерації АФК відбувається за депресії систем ферментативного протирадикального захисту, що призводить до активації процесів ліпопероксидації і ПМБ, які є одними з провідних механізмів альтераційної запальної реакції.

Призначення тваринам з ЕОА флогензиму знижувало інтенсивність ХМЛ на 35,0% і зменшувало вміст ДК у тканинах СХК у 2,2 раза. Тканинний рівень МА також зменшувався, але недостовірно, залишаючись більшим за контроль на 54,5%. Під впливом флогензиму нормалізуються резерви системи ферментативного АОЗ: активність СОД зростає на 71,2%, каталази – на 55,4%, ГП – на 60,2%. Проте активність усіх ферментів не перевищувала контрольних показників, що на фоні підвищення вмісту продуктів ліпопероксидації в СХК тканин свідчить про прихований дефіцит ємності системи ензиматичного АОЗ. Крім того, спостерігалось додаткове підвищення інтенсивності ПОБ – вміст нейтральних та основних альдегідо- і кетонпохідних ПМБ у тканинах синовії і

хряща уражених суглобів зростає більш ніж на порядок.

Інтенсифікація процесів генерації кисневих радикалів за пригнічення активності ферментів АОЗ вказує на ішемічний генез АФК, що підтверджується результатами електронної мікроскопії (рис. 1): в синовіальній оболонці уражених суглобів значно збільшувалася кількість мікросудин з потовщеними стінками і звуженими просвітами, що настає внаслідок набряку ендотеліальних клітин капілярів. Порушення мікроциркуляції зумовлені не тільки змінами ендотеліоцитів, але і втратою еритроцитами дзета-потенціалу, що призводило до феномену сладжу. Водночас у тварин, яким призначали флогензим, набряку ендотеліальних клітин

та сладжування еритроцитів у більшості капілярів синовіальної оболонки не спостерігалось (рис. 2).

У щурів з ОА значно зростає тканинний протеоліз: інтенсивність лізису НБ перевищувала таку контролю в 2,1 раза, ВБ – у 2,2 раза, колагену – в 2,3 раза. При цьому спостерігалось парадоксальне підвищення вмісту білка у тканинах СХК, який був більшим, ніж у контролі, на 41,9%. Під впливом флогензиму інтенсивність протеолітичної деструкції НБ зменшувалася на 30,1%, ВБ – на 36,0%, колагену – на 54,2%. Останній показник досягав контрольного рівня, тоді як перші два залишалися вищими за контроль відповідно на 49,5 та 40,1%. Вміст білка в СХК тканин скакального суглоба зменшу-

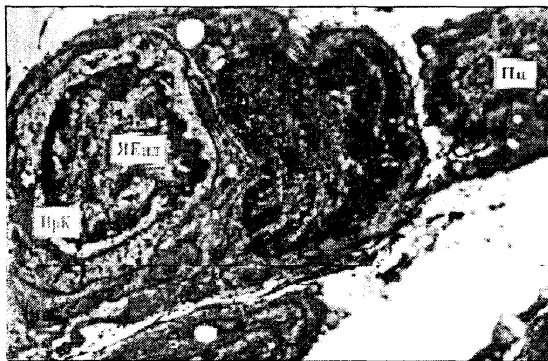


Рис. 1. Ультраструктура гемокапіляра синовіальної оболонки скакального суглоба при експериментальному остеоартрозі у нелікованих тварин: Прк – просвіт капіляра, ЯЕнд – ядро ендотеліоцита, Пц – перицит. Електронна мікрофотографія. Зб. х6000.



Рис. 2. Ультраструктура гемокапіляра синовіальної оболонки скакального суглоба при експериментальному остеоартрозі у нелікованих тварин. Електронна мікрофотографія. Зб. х6000.

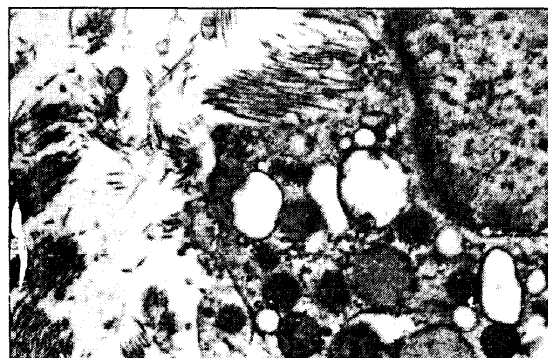


Рис. 3. Ультраструктурні зміни синовіоцитів синовіальної оболонки скакального суглоба при експериментальному остеоартрозі. Електронна мікрофотографія. Зб. х6000.

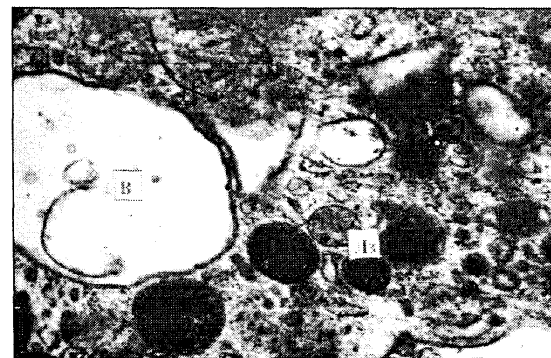


Рис. 4. Ультраструктурні зміни хондроцитів поверхнього шару скакального суглоба при експериментальному остеоартрозі: В – гігантська вакуоля, Лз – лізосома. Електронна мікрофотографія. Зб. х6000.

вався на 31,2% і відповідав такому в щурів контролю. Збільшення інтенсивності протеолітичної деструкції ВБ, НБ і колагену призводило до порушення нормальної ультраструктури синовіоцитів (рис. 3): значна їх частина мала розширені цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки, які містили матеріал слабкої електронної щільності. Мембрани останніх втрачали рибосоми. Окремі синовіоцити були бідні на гранулярну ендоплазматичну сітку, мали в цитоплазмі велику кількість везикул і вакуолей та поодинокі лізосоми.

Протеолітична атака була спрямована не лише на синовіальні клітини, але і на хондроцити, будова яких зазнавала значних патоморфологічних змін (рис. 4): редукція гранулярної ендоплазматичної сітки і комплексу Гольджі поєднувалася з набряком мітохондрій, дезорганізацією і зникненням крист. У набряклій цитоплазмі визначалася велика кількість лізосом, лізосомальних мембран, а залишки органел вільно розміщувалися серед зруйнованих колагенових волокон (рис. 5).

Отже, одним із джерел протеолітичних ферментів у зоні пошкодження синовії і хондроцитів скакального суглоба у щурів з ЕОА є лізосоми зруйнованих клітин. Крім того, за даними електронної мікроскопії, в різко змінених поверхневих ділянках хряща трапляються лейкоцити, що проникають у зону ураження із синовіальної рідини. Поліморфно-ядерні лейкоцити не тільки привносять додатковий протеолітичний потенціал, але і здатні підсилювати генерацію АФК в зоні асептичного запалення внаслідок "респіраторного вибуху" нейтрофілів, а зафіксована дегрануляція тучних клітин призводить до вивільнення нейтральних мастоцитарних протеаз.

Введення флогензиму тваринам з ЕОА у ранньому періоді розвитку патологічного процесу в суглобах у більшості випадків призводило до нормалізації ультраструктури синовіоцитів. Навколо синовіальних клітин спостерігаються проколагенові та зрілі колагенові фібрили з нормальною поперечною посмугованістю (рис. 6). Утворення останніх супроводжувалося гіпертрофією хондроцитів, які мали кулясте ядро, значну кількість мітохондрій, каналців гранулярної енд-

плазматичної сітки та міхурців комплексу Гольджі, що свідчить про інтенсифікацію репараційних процесів.

У щурів з ЕОА сумарна фібринолітична активність (СФА) тканин СХК знижувалася майже втричі, що відбувалося за збільшення неферментативної активності фібринолітичної активності в 2,8 раза і зменшення інтенсивності ензиматичного лізису фібрину в 5,2 раза. Порушувалася структура тканинного фібринолізу: НФА становить 53,2%, ферментативна фібринолітична активність (ФФА) – 46,8%, тоді як у контролі – 7,1 та 92,9% відповідно. Призначення тваринам флогензиму призводить до дворазового збільшення СФА в СХК тканин уражених суглобів, що зумовлено виключно підвищенням ФФА, оскільки інтенсивність неензиматичного лізису фібрину зменшувалася на 38,0%, внаслідок чого структура тканинного фібринолізу наближалася до такої у тварин контрольної групи. Це свідчить про те, що зміни тканинного фібринолізу в синовіальній оболонці і хрящі уражених суглобів у ранній період ЕОА характеризуються підвищенням НФА за значного пригнічення ФФА і зменшення СФА.

Отже, застосування СЕТ при ЕОА сприяє зменшенню інтенсивності генерації АФК і вмісту первинних продуктів ліпопероксидації в тканинах СХК та підвищує до контрольного рівня активність ферментів АОЗ, що відбувається за активації процесів ПМБ. СЕТ з використанням флогензиму на ранніх етапах формування патологічного процесу в суглобах сприяє активації механізмів репарації, які відновлюють структуру ураженого СХК тканин, суттєво знижує НБ і ВБ та нормалізує інтенсивність колагенолізу і вміст білка в тканинах СХК уражених суглобів, сприяє збільшенню інтенсивності ензиматичного лізису фібрину і наближає структуру сумарного тканинного фібринолізу до контрольних показників.

За результатами електронно-мікроскопічного аналізу, в нелікованих щурів з ОА між синовіоцитами скакального суглоба зазначається маса фібрину, який тісно контактує з цитолемою. Водночас при гістологічному дослідженні спостерігається утворення грануляцій з боку крайового шару синові-

альної оболонки, які наростають на хрящ, а деякі з них перетворюються на фіброзну тканину з утворенням шварт, що вростають у хрящ, деформуючи його (рис. 7). Зауважимо, що у тварин з ЕОА, яким призначали флогензим, подібних змін не виявлялося (рис. 8). Таким чином, пригнічення ферментативного фібринолізу в СХК тканин ураженого ОА суглоба призводить до відкладання фібрину, який поряд з фібронектином є матрицею для міграції фібробластів і росту фіброзної тканини. Активація фіброзогенезу зумовлює подальше порушення структур синовії та хряща, чому ефективно запобігає флогензим.

У щурів з ЕОА відбуваються суттєві зміни вмісту цитокінів у тканинах СХК уражених суглобів: рівень ІЛ-1 β зростав у 5,2 раза, ФНП α – на 74,6%, ТФР β – на 92,7%.

Під впливом флогензиму відбувається дворазове зменшення тканинного вмісту ІЛ-1 β , рівень ФНП α знижується на 34,9%, відповідаючи контрольним величинам, а кількість ТФР- β в синовії і хрящі уражених суглобів збільшується відносно контролю в 3,2 раза та на 67,3% перевищує таку у псевдолікованих тварин. Таким чином, для раннього періоду ЕОА характерним є значне підвищення вмісту прозапальних цитокінів у тканинах СХК, особливо ІЛ-1 β , що супроводжується збільшенням тканинного рівня ТФР- β . Кількість останнього суттєво підвищується в разі призначення щурам з ОА флогензиму, тоді як вміст ІЛ-1 β та ФНП α в тканинах уражених суглобів, навпаки, знижується.

Регресійний аналіз не виявив залежності між вмістом у СХК цитокінів та показни-

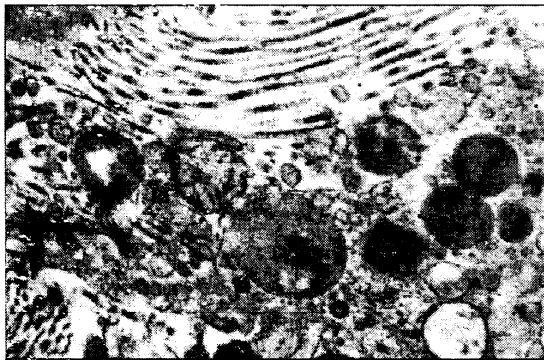


Рис. 5. Порушення цілісності плазматичної мембрани хондроцитів поверхневого шару скакального суглоба за експериментального остеоартрозу. Електронна мікрофотографія. Зб. $\times 6000$.



Рис. 6. Колагенові волокна поверхневого шару гіалінового хряща скакального суглоба щурів з експериментальним остеоартрозом, які отримували флогензим. Електронна мікрофотографія. Зб. $\times 6000$.



Рис. 7. Спайковий процес у скакальному суглобі при експериментальному остеоартрозі. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофото. Зб. $\times 70$.

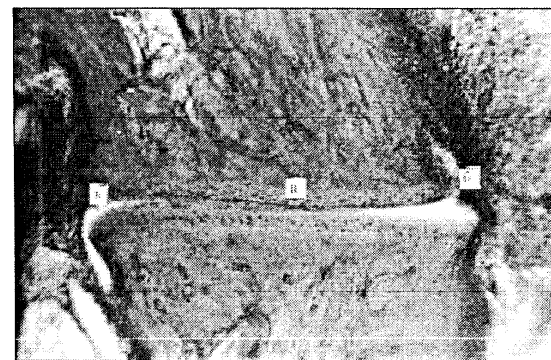


Рис. 8. Скакальний суглоб у щурів з експериментальним остеоартрозом, які отримували флогензим: а – гіаліновий хрящ, б – суглобова капсула, в – суглобова порожнина. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофото. Зб. $\times 35$.

ками ліпопероксидації, АОЗ, тканинного протеолізу і фібринолізу у контрольних щурів. У псевдолікованих тварин з ЕОА виявляються позитивні регресійні залежності між вмістом у тканинах СХК ІЛ- β та рівнем ДК, а також між рівнем ТФР- β_1 та інтенсивністю лізису колагену. У щурів з ОА, які отримували флогензим, вищенаведені кореляційні зв'язки не виявляються.

Отже, вміст ІЛ- 1β в СХК тканин у щурів з ЕОА позитивно корелює з інтенсивністю процесів ПОЛ, а рівень ТФР- β_1 прямо пов'язаний з КА – кореляції, які зникають після лікування тварин флогензимом.

Висновки. 1. Експериментально встановлено, що в ранньому періоді остеоартрозу в тканинах синовіально-хрящового комплексу відбувається різке збільшення вмісту ІЛ- 1β , що супроводжується підвищенням генерації активних форм кисню, депресією ферментативного протирадикального захисту, інтенсифікацією процесів ліпопероксидації, пероксидної модифікації білків, проте-

олізу і колагенолізу за значного пригнічення ферментативного фібринолізу та порушення ультраструктури синовіоцитів і хондроцитів.

2. За експериментального остеоартрозу системна ензимопатія (флогензим) значно збільшує внутрішньосуглобовий тканинний рівень ТФР- β_1 та інтенсивність ензиматичного лізису фібрину, зменшує утворення кисневих радикалів, знижує вміст у тканинах синовіально-хрящового комплексу ІЛ- 1β , ФНП α і продуктів ліпопероксидації, нормалізує колагеноліз та активність ферментів протирадикального захисту, суттєво зменшує протеолітичну деградацію низько- і високомолекулярних білків та знижує ступінь ультраструктурних змін у суглобових тканинах.

Перспективи наукового пошуку. Отримані результати передбачають доцільність подальшого обґрунтування впливу системної ензимотерапії на морфофункціональний стан хрящової тканини на молекулярному рівні з урахуванням інтенсивності перебігу апоптотичних та антиапоптотичних процесів

Література

1. Amin A.R. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage*. – 1999. – V. 7, № 4. – P. 392-394.
2. Pulsatelli L., Dolzani F., Piacentini A. et al. Chemokine production by human chondrocytes // *J. Rheumatol.* – 1999. – V. 26, № 9. – P. 1992-2001.
3. Lotz M., Hashimoto S., Kuhn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis // *Osteoarthritis Cartilage*. – 1999. – V. 7, № 4. – P. 389-391.
4. Van den Berg W.B. The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis // *Z. Rheumatol.* – 1999. – V. 58, № 3. – P. 136-141.
5. Guerne P.A., Desgeorges A., Jaspard J.M. et al. Effects of IL-6 and its soluble receptor on proteoglycan synthesis and NO release by human articular chondrocytes: comparison with IL-1. Modulation by dexamethasone // *Matrix Biol.* – 1999. – V. 18, № 3. – P. 253-260.
6. Studer R., Jaffurs D., Stefanovic-Racic M. et al. Nitric oxide in osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage*. – 1999. – V. 7, № 4. – P. 377-379.
7. Wallace P.M., MacMaster J.F., Rouleau K.A. et al. Regulation of inflammatory responses by oncostatin M // *J. Immunol.* – 1999. – V. 162, № 9. – P. 5547-5555.
8. Frenkel S.R., Saaden P.B., Mehrara B.J. et al. Transforming growth factor beta suprfamily members: role in cartilage modeling // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2000. – V. 105, № 3. – P. 980-990.
9. Pujol J.P. TGF-beta and osteoarthritis: in vivo veritas? // *Osteoarthritis Cartilage*. – 1999. – V. 7, № 5. – P. 439-440.
10. Алексеева Л.И. Современные представления о диагностике и лечении остеоартроза // *Рус. мед. ж.* – 2000. – Т. 8, № 9. – С. 377-382.
11. Мазуров В.И., Лиля А.М., Стернина Ю.И. Системная энзимотерапия. – СПб.: Моби Дик, 1995. – 160 с.
12. Системная энзимотерапия в ревматологии: Пер. с чешск. / Под ред. М.Вальда, М.Гонзикова, З.Масиновского и др. – СПб., 1999. – 96 с.
13. Коваленко В.М. Системна ензимотерапія // *Лікування та діагностика*. – 1996. – № 4. – С. 33-35.
14. Коваленко В.Н. Системная энзимотерапия: теоретические основы и опыт клинического применения // *Провизор*. – 1996. – № 6. – С. 4-8.

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ХРЯЦА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ОСТЕОАРТРОЗІ ЗА СИСТЕМНОЇ ЕНЗИМОТЕРАПІЇ

О.В.Пішак

Резюме. У ранньому періоді експериментального остеоартрозу значне підвищення вмісту інтерлейкіну 1β у тканинах синовіально-хрящового комплексу асоційовано з активацією механізмів альтерації синовіоцитів і хондроцитів. Системна ензимотерапія (флогензим) різко збільшує рівень трансформувального фактора росту β_1 та фактора некрозу пухлин α . Це супроводжується пригніченням процесів ліпопероксидації, протеолітичної деструкції низько- та високомолекулярних білків за підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту та інтенсивності ензиматичного лізису фібрину.

Ключові слова: морфологія, хрящ, експериментальний остеоартроз, системна ензимотерапія.

PECULARITIES OF CARTILAGE MORPHOLOGICAL CHANGES IN EXPERIMENTAL OSTEOARTHRISIS IN CASE OF SYSTEMIC ENZYMOTHERAPY

O.V.Pishak

Abstract. A considerable increase of the Interleukine 1β content in the tissues of the synovial-cartilaginous complex is associated with an activation of the alteration mechanisms of synoviocytes and chondrocytes at an early stage of experimental osteoarthritis. Systemic enzymotherapy (Flogenzym) sharply increases the level of the Transforming Growth Factor- β_1 and Tumor Necrosis Factor- α . This is accompanied by inhibition of lipoperoxidation processes, proteolytic destruction of low-end high molecular weight proteins against a background of the increased activity of antioxidant protection enzymes and the intensity of enzymatic fibrinolysis.

Key words: morphology, cartilage, experimental osteoarthritis, systemic enzymotherapy.

Bukevianin State Medical Academy (Chernivtsi)

Надійшла в редакцію 29.07.2003 р.