

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЛЮКОЗАМИНА ГИДРОХЛОРИДА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННЫХ СТРУКТУРАХ

И. А. Зупанец¹, Н. В. Бездетко¹, Н. В. Дедух², И. А. Отришко¹

Изучено влияние глюкозамина гидрохлорида на репаративные и метаболические процессы в суставном хряще на модели посттравматического остеоартроза и в роговице на модели посттравматического кератита. Показано, что глюкозамина гидрохлорид оказывает стимулирующее действие на репаративные процессы в структурах соединительнотканного происхождения, способствует ингибированию в них дистрофических посттравматических процессов. Вероятным механизмом репаративного действия глюкозамина гидрохлорида является стимулирование синтеза гликозаминогликанов и коллагена.

Ключевые слова: соединительная ткань, репарация, глюкозамин

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения метаболизма соединительной ткани (СТ) являются важным элементом патогенеза многих заболеваний, нередко определяющим исход патологии [9, 10, 15, 17]. В то же время, лекарственные препараты, нормализующие обменные процессы и повышающие репаративные возможности соединительнотканых структур, немногочисленны.

К производным СТ относят суставной хрящ и роговицу глаза [2, 9, 12]. Эти ткани близки по морфологическому строению и биохимическому составу. Общими особенностями являются отсутствие кровеносных сосудов, диффузный характер питания, высокое содержание коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ). Как в хряще, так и в роговице дисахаридные единицы ГАГ в значительном количестве содержат Д-глюкозамин [1, 6, 10, 19], что позволяет предположить участие этого аминсахара в метаболических процессах данных соединительнотканых структур.

Целью исследования явилось экспериментальное изучение влияния глюкозамина гидрохлорида на метаболические и репаративные процессы в соединительнотканых структурах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованы модели посттравматического остеоартроза у крыс [3] и проникающей травмы роговицы у кроликов. Опыты проведены на 60 белых крысах массой 180–250 г и 48 кроликах породы шиншилла массой 3–3,5 кг. У крыс под гекасеналовым наркозом посредством бокового доступа вскрывали тазобедренный сустав и кератомом наносили стандартный дефект диаметром 2 мм, проникающий через суставной хрящ в суставную кость. Глюкозамина гидрохлорид (ГА) в виде 20 % раствора вводили внутримышечно 1 раз в сутки. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Через 30 дней животных умерщвляли парами эфира [14]. Материалом для исследования служили головки бедренной кости. У кроликов под местной анестезией в периферической части роговицы ножом

Graefe наносили проникающее линейное ранение протяженностью 5 мм. Первой группе животных ГА вводили внутримышечно 1 раз в сутки, второй — инстиллировали в конъюнктивальную полость 3 раза в день в виде 20 % раствора, который готовили экстенпорально из субстанции фирмы “Sigma” в соответствии с проектом временной фармакопейной статьи на производство лекарственной формы глюкозамина гидрохлорида — раствора для инъекций [8]. В контрольной группе инстиллировали физиологический раствор. Через 14 дней животных методом воздушной эмболии выводили из опыта. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван Гизону. Для анализа макромолекул матрикса суставного хряща и роговицы — ГАГ и коллагена — были поставлены гистохимические топооптические реакции с толуидиновым синим [11] и пикросирусом красным [22], позволяющие по величине рефракции в поляризованном свете судить об ориентационной упорядоченности данных макромолекул. Результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием критериев Фишера-Стьюдента с помощью компьютерных программ [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе животных с посттравматическим остеоартрозом макроскопически в головке бедренной кости четко определялось место дефекта в виде небольшого углубления (2–3 мм). Вблизи дефекта хрящ тусклый, с желтоватым оттенком, на остальном протяжении — белый, блестящий.

Микроскопически в контроле выявлялся дефект в хрящевом покрытии, базофильная линия вблизи дефекта была нарушена, костные балки истончены, костно-мозговые полости ниже зоны дефекта заполнены клеточно-волокнистой тканью. Края дефекта со стороны суставного хряща неровные, без клеток, толщина хряща резко снижена. Как вблизи дефекта, так и на расстоянии от него отмечались трещины, щели, бесклеточные участки, участки разрушения хряща с резко нарушенной цитоархитектоникой. Зона дефекта во всех случаях была выполнена слоями клеточно-волокнистой ткани различной толщины и клеточности, которые не достигали уровня хрящевого покрытия головки. Коллагеновые волокна в дефекте плотно упакованы, между ними определяется большое количество удлинённых клеток фибропластического ряда с крупными гиперхромными ядрами и базофильной цитоплазмой. Наряду с дистрофическими изменениями

¹ Кафедра клинической фармации (зав. — проф. И. А. Зупанец) Национальной фармацевтической академии Украины, Харьков, 61002, ул. Пушкинская, 53.

² Институт патологии позвоночника и суставов им. М. И. Ситенко АМН Украины, Харьков, 61002, ул. Пушкинская, 80.

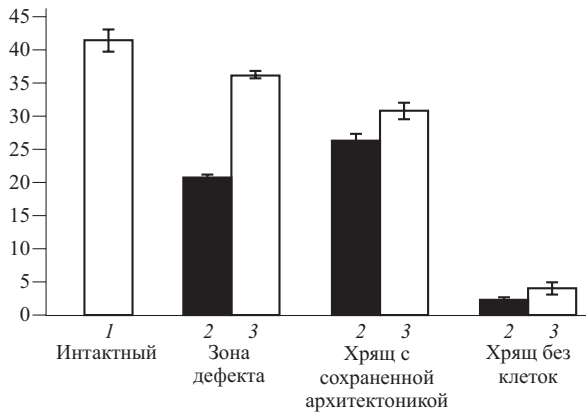


Рис. 1. Рефракция гликозаминогликанов (в нм) в различных участках соединительнотканых структур при экспериментальном остеоартрозе на фоне введения глюкозамина гидрохлорида. Участки суставного хряща: 1 — интактный; 2 — контроль; 3 — опыт.

определялись признаки репарации, связанной с развитием хондронной ткани в костно-мозговых полостях вблизи бесклеточных зон, трещин и щелей. В таких участках хондробласты располагались беспорядочно, имели большие гиперхромные ядра и базофильную цитоплазму. Участки хряща с сохраненной citoархитектоникой и хондрокитами занимали незначительные территории. В целом репаративный процесс характеризовался как слабо выраженный.

При анализе состояния хрящевого матрикса (макромолекул ГАГ и коллагена) установлено проявление слабой метахромазии и рефракции ГАГ в участках хряща без клеток, прилежащих к зоне дефекта. В зоне дефекта рефракция ГАГ была снижена, а в отдаленных от дефекта зонах достигала достаточно высоких значений (рис. 1). Рефракция коллагена в зоне дефекта была в 1,7 раза ниже, чем на остальной территории хряща.

При применении ГА макроскопически в головках бедренной кости место дефекта определялось с трудом — в виде белесоватого пятна, несколько менее блестящего, чем остальная поверхность хряща. Микроскопически отмечались признаки репаративного процесса: разрастание гиалиновой хрящевой ткани в зоне дефекта, замещение матрикса бесклеточного суставного хряща молодым гиалиновым, активация остеогенеза в участках, прилежащих к дефекту. Большая часть хрящевого покрытия сохраняла характерную для интактного суставного хряща citoархитектонику. Выраженных деструктивных изменений в хряще (трещин, щелей) не выявлено. Развивающийся репаративный процесс и хондропротекторное действие ГА были оценены как выраженное.

В поляризационном свете отмечалась яркая метахромазия и выраженная рефракция ГАГ в участках новообразованной гиалиновой хрящевой ткани, которая превышала значение таковой контроля в 1,7 раза. На остальных участках хряща рефракция ГАГ была также выше контрольных значений: в бесклеточных — в 1,7 раза, а в зоне хряща с неизменной citoархитектоникой — в 1,4 раза (рис. 1).

Клинико-офтальмологическое обследование животных с экспериментальным кератитом показало, что применение ГА, как в инъекциях, так и в виде инстилляций

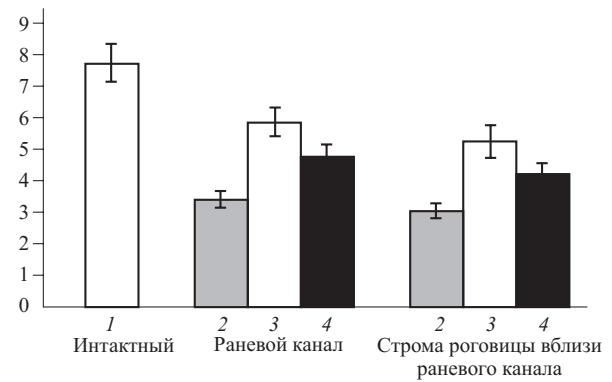


Рис. 2. Рефракция гликозаминогликанов (в нм) в различных участках роговицы при экспериментальном кератите на фоне введения глюкозамина гидрохлорида.

Участки роговицы глаза: 1 — интактный; 2 — контроль; 3 — ГА местно; 4 — ГА в инъекциях.

значительно уменьшает проявление воспалительной реакции, ускоряет реэпителизацию раневой поверхности роговицы, способствует формированию нежного полупрозрачного рубца.

При микроскопическом исследовании в контрольной группе обнаруживался слабо выраженный репаративный процесс: раневой канал широкий, покрыт эпителием, четкая послойная дифференцировка клеток эпителия отсутствует, можно выделить только слой плоских клеток, расположенный на поверхности. Новообразованный эпителиальный пласт значительно утолщен по сравнению с эпителием в сохраненных участках вдали от зоны дефекта. Раневой канал заполнен клетками фибропластического ряда и макрофагами, обнаруживаются островки фибрина. Клетки располагаются в различном направлении, в том числе и перпендикулярно по отношению к слоям коллагеновых волокон и кератоцитам неповрежденной части роговицы. Десцеметова мембрана и эндотелий в зоне дефекта отсутствовали. В поляризованном свете выявлена полная изотропия зоны раневого канала, что свидетельствует об отсутствии ориентационной упорядоченности коллагеновых волокон. Пучки коллагеновых волокон вблизи зоны дефекта были разрыхлены и частично фрагментированы, часть из них контурно изменена. Между волокнами в большом количестве определялись деструктивные трещины и щели, заполненные детритом. Фибриллогенез между пучками коллагеновых волокон, прилежащих к зоне дефекта, практически не обнаруживался. В участках стромы роговицы, удаленной от зоны дефекта четко определялись слои коллагеновых волокон, между которыми располагались фибробласты. ГАГ в зоне раневого канала и в новообразованном эпителии обнаруживались в следовом количестве, в зоне, прилежащей к раневому каналу, метахромазия ГАГ была резко снижена (рис. 2).

Отличительной особенностью течения репаративного процесса в группе животных, получавших инстилляцию ГА, явилась полная эпителизация раневого канала, значительное уменьшение в нем плотности клеток. Новообразованный эпителиальный пласт был утолщен незначительно по сравнению с прилегающими участками. В нем обнаруживалась дифференцировка клеток с формирова-

нием характерных слоев. В зоне раневого канала клетки в большинстве случаев располагались параллельно слоям коллагеновых волокон, формирующих строму роговицы в этом участке. Изучение состояния коллагена обнаружило в зоне дефекта новообразованные пучки коллагеновых волокон, расположенные параллельно основному массиву и внедряющиеся в пространство между пучками стромы роговицы. Трещин и щелей между коллагеновыми волокнами стромы роговицы не выявлено. Метахромазия ГАГ в зоне дефекта была увеличена, ГАГ относительно равномерно располагались между пучками коллагеновых волокон стромы и в новообразованном эпителиальном пласте. В целом репаративный процесс в роговице под влиянием ГА оценен как выраженный.

При введении ГА в инъекционной форме в роговице имелась та же направленность процессов.

Макромолекулярный состав соединительнотканного матрикса — ГАГ и коллаген являются важнейшими интегральными показателями течения репаративного процесса. ГАГ рассматриваются в качестве матрицы для ориентированного расположения коллагеновых волокон [7, 9, 17, 20]. Проведенное исследование свидетельствует, что ГА значительно стимулирует биосинтез ГАГ как в хондроцитах, так и в кератоцитах. Метахромазия ГАГ существенно увеличивается непосредственно в зоне дефекта, а также в прилежащих к нему участках. Характерной особенностью макромолекулярной архитектоники раневого дефекта как в хряще, так и в роговице под влиянием ГА является ориентированное расположение макромолекул коллагена, что имеет особое значение для сохранения оптической функции роговицы. Выраженная стимуляция фибрилlogenеза также может быть связана с увеличением синтеза ГАГ. Известно, что провизорным матриксом для продвижения и временной адгезии эпителия к строме служит фибронектин. Весьма вероятно, что глюкозамин, входящий в качестве структурной единицы в макромолекулу фибронектина, также обладает способностью положительно влиять на этот процесс [18, 20, 21]. Влияние ГА на метаболические и репаративные процессы в различных структурах соединительнотканного происхождения имеет одинаковую направленность, что подтверждают наши данные.

ВЫВОДЫ

1. Глюкозамина гидрохлорид оказывает стимулирующее влияние на репаративные процессы в структурах соединительнотканного происхождения (суставной хрящ,

роговица), а также способствует ингибированию в них дистрофических посттравматических процессов.

2. Вероятным механизмом репаративного действия глюкозамина гидрохлорида является стимулирование синтеза гликозаминогликанов и коллагена.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. К. Бурчинская, *Ж. практич. врача*, № 6, 33 – 35 (1996).
2. *Гистология*, Э. Г. Улумбекова (ред.), ГЭОТАР, Медицина, Москва (1999).
3. С. М. Дроговоз, И. А. Зупанец, Н. В. Бездетко и др., *Тез. докл. обл. конф.*, Харьков (1989), сс. 35 – 38.
4. Л. С. Киценко, Т. Б. Иванова, *Матер. VII Рос. нац. конгр. "Человек и лекарство"*, Москва (2000), с. 244.
5. С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич, *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*, Морион, Киев (2000).
6. Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл, *Биохимия человека*, Мир, Москва (1993), Т. 2, сс. 299 – 310.
7. *Остеоартроз. Консервативна терапія*, М. О. Коржа, Н. В. Дедух (ред.), І. А. Зупанця, Прапор, Харьков (1999).
8. Патент РФ (RU) № 02118156 С1, 6 А 61 К 9 / 08, 31 / 70.
9. В. В. Серов, А. Б. Шехтер, *Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология)*, Медицина, Москва (1981).
10. R. E. Anderson, *Fundamentals and principles of ophthalmology*, San Francisco (1998), pp. 303 – 380.
11. V. S. Constantine and R. W. Mowry, *J. Invest. Derm.*, **50**, 419 – 423 (1968).
12. B. S. Fine and M. Yanoff, *Ocular Histology*, MD: Harper & Row Hagerstown (1979).
13. M. S. Gottlieb, *J. Manipul. Physiol. Ther.*, **20**, 400 – 414 (1997).
14. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, Canadian Council on Animal Care, Ottawa (1984).
15. T. E. Hardingham and B. Caterson, *Biochemistry of articular cartilage and joint disease*, in: R. G. G. Russel and P. A. Dieppe: Osteoarthritis. IBC Technical Services Ltd., London (1991), pp. 51 – 64.
16. G. S. Kelly, *Altern. Med. Rev.*, **3**, 27 – 39 (1998).
17. P. Locci, E. Becchetti, G. Venti, et al., *Biol. Cell*, **86**, 73 – 78 (1996).
18. C. J. Lozada and R. D. Altman, *Bull. Rheum. Dis.*, **46**, 5 – 7 (1997).
19. M. F. Mc Carty, *Med. Hypotheses*, **50**, 507 – 510 (1998).
20. T. Mori, M. Okumura, M. Matsuura, et al., *Biomaterials*, **18**, 947 – 951 (1997).
21. A. Passi, R. Albertini, F. Campagnari, et al., *FEBS Lett.*, **420**, 175 – 178 (1997).
22. G. Romhanyi, *Acta Histochem.*, **15**, 210 – 233 (1963).

Поступила 23.10.2001

EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF THE EFFECT OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE ON THE METABOLIC AND REPAIR PROCESSES IN CONNECTIVE-TISSUE STRUCTURES

I. A. Zhupanets¹, N. V. Bezdetko¹, N. V. Dedukh², and I. A. Otrishko¹

¹ Clinical Pharmacy Department, National Pharmaceutical Academy of Ukraine, ul. Pushkinskaya 53, Kharkov 61002, Ukraine

² Institute of Vertebroarticular Pathology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

The effects of glucosamine hydrochloride on the metabolic and repair processes were studied on a model of post-traumatic osteoarthritis in the articular cartilage and on a model of post-traumatic keratitis in the cornea. The administration of glucosamine hydrochloride stimulated repair and favored inhibition of dystrophic post-traumatic processes in the connective-tissue structures. It is suggested that a probable mechanism of the drug action consists in stimulation of the synthesis of glucosaminoglycans and collagen.