

© Е.Л. Матвеева, Т.В. Русова, 1997.

Особенности метаболизма протеогликанов синовиальной жидкости коленного сустава собак с иммобилизацией конечности

Е.Л. Матвеева, Т.В. Русова

Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова, г. Курган
(Генеральный директор — академик РАМТН, д.м.н., профессор, заслуженный деятель наук РФ В.И. Шевцов)

В синовиальной жидкости коленного сустава собак с иммобилизованной конечностью определяли содержание ГАГ по количеству уроновых кислот, сульфатированных ГАГ и активность ферментов лизосом - кислой фосфатазы, β -N-ацетилглюкозаминидазы, гиалуронидазы и катепсина Д. Эти параметры сравнивали с таковыми в синовиальной жидкости контралатеральной конечности и у нормальных собак. Выявлены значительные изменения в качественном и количественном составе ГАГ и активности указанных лизосомальных ферментов.

Ключевые слова: собаки, синовиальная жидкость, коленный сустав, протеогликаны, лизосомальные ферменты.

В связи с исследованием некоторых сторон патогенеза заболеваний суставов в последнее десятилетие особое внимание привлекает матрикс параартикулярных тканей, межклеточное вещество которого состоит из двух основных органических компонентов: коллагена и протеогликанов (ПГ). Альтерация последних, как считают, играет ведущую роль в механизме развития дегенеративно-дистрофических изменений суставов [1, 2, 3]. При деформирующем артрозе, самой распространенной форме дистрофических поражений суставов, в настоящее время наиболее полно изучен суставной хрящ. Другие компоненты сустава при указанной болезни изучены в меньшей степени. Работы, посвященные одновременному изучению тканей суставов и синовиальной жидкости при различ-

ных формах заболеваний суставов, выполнены в основном, морфологами [4, 5]. Между тем, комплексные биохимические исследования позволяют более полно оценить функциональные взаимоотношения основных элементов сустава в различных патологических условиях и приблизиться к выяснению некоторых звеньев патогенеза.

Задача данной работы - биохимическое изучение синовиальной жидкости собак с иммобилизацией коленного сустава для выяснения изменений в количественном и качественном составе гликозаминогликанов (ГАГ) и лизосомальных ферментов при развитии дегенеративно-дистрофических изменений суставов, активность которых определяет поступление метаболитов в синовиальную жидкость [6].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент с иммобилизацией коленного сустава у собак был проведен на 5 взрослых беспородных животных обоего пола. Ограничение функции сустава достигалось наложением на сустав предложенного нами устройства для иммобилизации, состоящего из разъемных перфорированных манжет из поливика, соединенных стандартными стержнями аппарата Илизарова. Данное устройство допускало микроподвижность в суставе, накладывалось на срок 6 недель. Рентгенографию иммобилизованного сустава выполняли на 1, 24 и 42-е сутки от начала эксперимента. Синовиальную жидкость забирали после эвтаназии животного, которую осуществляли введением летальной дозы 10%-го раствора новокаина. В качестве контроля использовали синовиальную жидкость нормальных собак.

После измерения объема полученной синовиальной жидкости в ней определяли количест-

во белка по Лоури и активность лизосомальных ферментов: кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2), катепсина Д (КФ 3.4.23.5), β -N-ацетилглюкозаминидазы (КФ 3.2.1.30) [7] и гиалуронидазы (КФ 3.2.1.35/36) [8]. Для осаждения и очистки ГАГ использовали модифицированный метод [9, 10].

После высушивания и растворения образцов в воде в них определяли содержание уроновых кислот карбазоловым методом [11] и количество сульфатированных ГАГ колориметрической реакцией с алциановым голубым 8GX по Гоулду [12].

Электрофоретическое разделение ГАГ синовиальной жидкости проводили в двух системах буферов: 0,1M LiCl буфере с градиентом pH 3,8-2,0 и 0,07M ацетата бария буфере pH 5,0 в 1% агарозном геле. Электрофореграммы окрашивали 0,1% толуидиновым синим в 1% уксусной кислоте и отмывали в 1% уксусной кислоте [15].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась общепринятым методом с вычислением средней арифметической и ошибки средней арифметической. Достовер-

ность различий результатов в опытной и контрольной группе проверяли непараметрическим критерием Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя полученные данные (таблица) и сравнивая их с таковыми, полученными в группе нормальных собак, можно отметить, что количество уроновых кислот достоверно ($P < 0,05$) снижается в синовиальной жидкости иммобилизованной конечности и незначительно в контралатеральной. Количество сульфатированных ГАГ значимо ($P < 0,05$) возрастает в опытной и недостоверно в контралатеральной конечности.

При электрофоретическом разделении ГАГ (рисунок) как в опытной, так и в контралатеральной конечности, выявили наличие дополнительной фракции ГАГ, которая была идентифицирована нами как кератансульфат. Изменение степени полимерности гиалуроновой кислоты как в опытной, так и в контралатеральной конечности доказывается увеличением ее электрофоретической подвижности в агарозном геле.

Таким образом, снижение общего количества уроновых кислот и возрастание количества сульфатированных ГАГ в синовиальной жидкости иммобилизованной конечности можно объяснить изменением спектра ГАГ - появлением фракции кератансульфата. Эту же тенденцию можно отметить и в синовиальной жидкости контралатеральной конечности.

Как видно из таблицы, активность изученных ферментов лизосом в синовиальной жидкости у здоровых животных невелика, а активность гиалуронидазы вообще не определяется. В этой среде наиболее надежно определяются актив-

ность катепсина Д и β -N-ацетилглюкозаминидазы, что подтверждается и сведениями из литературы [11]. В экспериментальной группе животных их активность возрастает, причем в контралатеральном суставе несколько больше, чем в опытном, но эта разница не достоверна ($P < 0,05$). Активность гиалуронидазы определяется в небольших количествах. Таким образом, отмеченные изменения активности лизосомальных ферментов незначительны и не могут существенно повлиять на агрегированность протеогликанов, поскольку в синовиальной жидкости присутствуют ингибиторы лизосомальных ферментов - нейтральные протеазы [13,14,15]. Именно эти нейтральные протеазы могут существенно определять деструкцию белкового кора ПГ. Изменение агрегированности гиалуроновой кислоты (ГК) синовиальной жидкости, отмеченное нами, можно объяснить либо за счет нарушения ее синтеза клетками синовио, либо за счет интенсификации процессов перекисного окисления в тканях сустава [16].

Таким образом, отмеченные нами изменения в составе и агрегированности ГАГ синовиальной жидкости иммобилизованных суставов могут быть связаны как с изменением синтеза этих соединений, так и с активацией кислых и нейтральных протеаз параартикулярных тканей. Следует отметить, что общие изменения стереотипа движения не оставляют интактным и контралатеральный сустав.

Таблица 1

Результаты биохимических тестов синовиальной жидкости коленных суставов опытной и контралатеральной конечности собак с иммобилизацией сустава и группы нормальных собак.

Суставы	Биохимические показатели					
	УК	S-ГАГ	КФ	катД	β -НАГА	Гиалур-за
Иммобилизованный	215,9+59,2	575,6+139,5	2,1+0,4	1,0+0,23	0,4+0,07	5,3+2,4
Контралатеральный	359,9+33,1	344,5+119,1	1,5+0,7	0,66+0,07	0,31+0,03	28,0+10,2
Нормальный	378,5+67,3	239,8+51,0	0,24+0,05	0,2+0,007	0,20+0,003	0

Обозначения:

УК - уроновые кислоты (мкг/мл)

S-ГАГ - сульфатированные ГАГ (мкг/мл)

КФ - кислая фосфатаза (мкМ Pi/мг белка час) катД - катепсин Д (мкМ тирозина/мг белка час)

β -НАГА - β -N-ацетилглюкозаминидаза (мкМ п-нитрофенола /мг белка час)

Гиалур-за - гиалуронидаза (нМ N-ацетилглюкозамина/мг белка час).

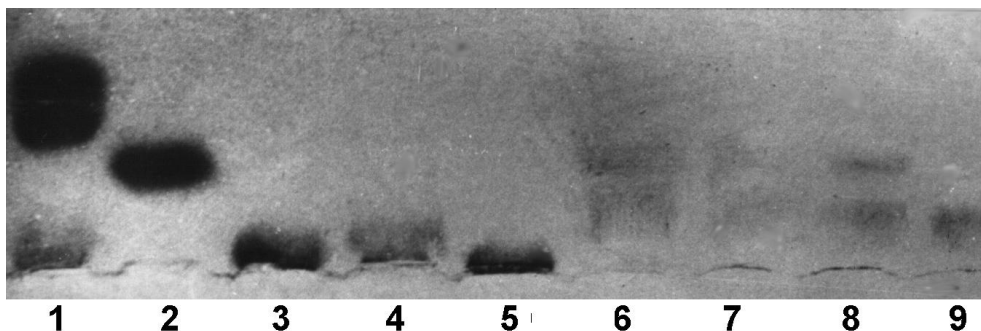


Рис.1 Электрофореграмма протеогликанов синовиальной жидкости коленных суставов собак в 1% агарозном геле 0,1М LiCl буфере, pH 3,8-2,0.

- 1-смесь стандартов (хондроитин сульфат, гепарин, гиалуроновая кислота)
- 2-стандарт кератансульфата
- 3-стандарт гиалуроновой кислоты
- 4-синовиальная жидкость нормального сустава
- 5-синовиальная жидкость нормального сустава
- 6-синовиальная жидкость иммобилизованного сустава
- 7-синовиальная жидкость контралатерального сустава
- 8-синовиальная жидкость иммобилизованного сустава
- 9-синовиальная жидкость контралатерального сустава

ЛИТЕРАТУРА

1. Итоги длительного изучения механизмов дегенерации суставного хряща при первичном деформирующем артрозе /М.Г. Астапенко, Т.И. Копьева, И.М. Фильчаган и др. // Терапевтический архив. - 1982. - Т.54, № 6. - С.115-121.
2. Роль протеогликанов в патогенезе деформирующего артроза / И.И. Жаденов, Д.В. Косягин, В.Б. Пастель и др. // Труды IV Всесоюзного съезда травматологов-ортопедов. - М., 1982. - С.291-293.
3. Косягин Д.В. Протеогликаны суставного хряща человека в норме и при возрастных дегенеративных изменениях // Вопр. мед. химии. - 1982. - № 4. - С.68-71.
4. Павлова В.Н.и др. Хрящ / В.Н.Павлова, Т.И.Копьева, Л.И. Слущкий. - М.: Медицина, 1988. - 317с.
5. Дедух Н.В.и др. Остеоартрозы. Пути фармакологической коррекции / Н.В. Дедух, И.А Зупанец, В.Ф. Черных, С.М. Дроговоз. - Харьков, 1992. - 140с.
6. Lonmänder S., Saxne T.,Heinegard D. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis // Ann. Rheum. Dis.- 1994. -Vol.53. - P.8-13.
7. Barret A.J. Tissue proteinases / Eds A.J. Barret, J.T. Dingle. - Amsterdam-London: Noth-Holland Publ. Co, 1971. - 468p.
8. Aronson N.N., Davidson E.A. Lisosomal hyaluronidase // J. Biol.Chem. - 1965. - Vol. 240. - P.3222-3224.
9. Карякина Е.В. Определение гликозаминогликанов синовиальной жидкости // Лаб. дело. - 1987. - N1. - С.51-53.
10. Рыкова В.И., Роничевская Г.М., Салганик Р.И. Химические и биологические свойства кейлоноподобных протеогликанов из тканей животных // Изв. СО АН СССР. - 1982. - Вып. 2. - С.144-150.
11. Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. // Analit. Biochem. - 1962. - N 4. - P.330-334.
12. Gold E.W. A simple spektrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentrations // Analit.Biochem. - 1979. - N 1. - P.183-188.
13. Synthesis and degradation of hyaluronic Acid by synovial macrofages / J.Goldbach, R .Miehlke., M.Schneider, P.Prehm // Biol. Chem. - 1989. - Vol.370, N 9. - P.901.
14. Davies Ph., Allison A.C. The secretion of lisosomal enzymes // Lysosomes in Biology and Pathology. - 1974.- Vol.2.- P. 61-98.
15. Ghost P. Lysosomal enzymes in joint disease // Austr. N. J. Med. - 1978. - Vol.8, supl.1. -P.12-15.
16. Hata R., Nagai Y. A rapid and micro method for separation of acidic glycosaminoglycans by two-dimensional electrophoresis // Analit.biochem. - 1972. - N 2. - P.462-468.

Рукопись поступила 10.12.96.