

© Е.Л. Матвеева, Т.В. Русова, В.Д. Макушин, 1997

Изменения метаболизма протеогликанов в синовиальных тканях коленного сустава собак в разных биомеханических условиях

Е.Л. Матвеева, Т.В. Русова, В.Д. Макушин

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 работе анализируется изменение метаболизма ПГ тканей сустава и синовиальной жидкости при изменении условий функционирования конечности. Произведен сравнительный анализ количественного и качественного состава ГАГ этих тканей и активности лизосомальных ферментов. Проведен корреляционный анализ активности ферментов лизосом и показателей метаболизма протеогликанов тканей коленного сустава собак. На основании полученных результатов установлено, что в суставном хряще, синовиальной оболочке и синовиальной жидкости имеет место тесная взаимосвязь и взаимозависимость метаболизма указанных соединений. Развитие дегенеративно-дистрофических процессов обусловлено не только нарушением состояния матрикса хряща, но и изменениями биосинтетической функции клеток синовиальной оболочки и лубрикационных свойств синовиальной жидкости.

Ключевые слова: коленный сустав, протеогликаны, гликозаминогликаны, лизосомальные ферменты.

Changes of proteoglycan metabolism of the knee tissues and synovial fluid in different functional conditions of a limb are analysed in the work. Comparative analysis of quantitative and qualitative composition of glycosaminoglycans (GAG) in these tissues and that of lysosomal enzyme activity is made. Correlation analysis of lysosomal enzyme activity and indices of proteoglycan metabolism in the canine knee tissues is made as well. On the basis of the obtained results it is established, that there is close connection and dependence between metabolism of the mentioned compounds in the articular cartilage, synovial membrane and synovial fluid. Development of degenerative processes is caused not only by disorder of the cartilaginous matrix condition, but by changes of biosynthetic function of the synovial membrane cells and by those of lubrication qualities of the synovial fluid.

Keywords: the knee, proteoglycans, glycosaminoglycans, lysosomal enzymes.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы достигнуты ощутимые успехи в области исследований патологии суставов, но сохраняются трудности в своевременной диагностике дегенеративно-дистрофических изменений суставов, выборе правильной тактики лечения и адекватной ее реализации. При деформирующем остеоартрозе наиболее полно изучены изменения суставного хряща [1,2]. Другие компоненты сустава при указанной болезни изучены в меньшей степени. В нашем Центре был выполнен ряд исследований, посвященных изучению деструктивных изменений в суставном хряще при коррекции патологии опорно-двигательного аппарата. Работы К.С.Десятниченко, С.Н. Асоновой, Л.И. Грачевой, С.Н. Луновой показывают, что изменения условий функционирования сустава влечет за собой биохимические, биомеханические и мор-

фологические перестройки суставного хряща [3]. Комплексные исследования биохимических особенностей тканей суставов и синовиальной жидкости позволяют более полно оценить функциональные взаимоотношения основных элементов сустава в различных патологических условиях и приблизиться к выяснению отдельных звеньев патогенеза дегенеративно-дистрофических поражений суставов. Продолжая направление биохимических исследований в артрологии, мы посчитали необходимым провести изучение сустава в комплексе тканей и дать анализ состояния суставных структур для выявления как характера взаимоотношения этих составляющих сустава, так и роли каждой из них в условиях нарушения диффузно-нагрузочного механизма суставной трофики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 29 беспородных собаках обоего пола в возрасте от 1 года до 4 лет с массой тела 10-20 кг. Материал исследования распределен на 3 серии: интактные животные, собаки с иммобилизацией коленного сустава

и животные с удлинением голени.

Первую - контрольную - серию составили 10 животных. Во второй серии моделировали дегенеративно-дистрофические изменения коленных суставов животных: взрослым беспородным

собакам (10 животных) производили стабильную фиксацию коленного сустава в физиологическом положении стоя, устройством предложенной нами конструкции, состоящим из 3 разъемных перфорированных развальцованных манжет из поливика, соединенных между собой стандартными деталями аппарата Илизарова (рис. 1). Животных выводили из эксперимента через 42 дня иммобилизации.

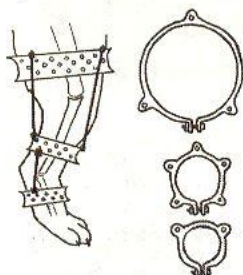


Рис. 1. Схема устройства для иммобилизации конечностей у животных (В.Д. Макушин, Е.Л. Матвеева. Положительное решение по заявке на изобретение № 97103272/13 от 4.03.97 г.)

В третьей серии эксперимента 9 взрослым беспородным животным после закрытой флекссионной остеоклазии берцовых костей производили удлинение голени. Для фиксации фрагментов кости при ее удлинении применяли аппарат Илизарова. Удлинение голени начинали через 5 дней после закрытой флекссионной остеоклазии. Дистракцию осуществляли по 1мм в сутки за 8 приемов.

Собак выводили из опыта введением летальной дозы барбитуратов через 14, 28 дней дистракции, 30 дней фиксации и месяц после снятия аппарата. Исследовали ткани коленного сустава оперированной и контралатеральной конечности. Операции выполнены А.А. Шрейнером и

С.А. Ерофеевым.

Выделение гликозаминогликанов (ГАГ) для исследования их количественного и качественного состав проводили, модифицируя описанные методы [4,5]. Схема примененного нами метода приведена на рис. 2.

Проведено комплексное исследование суставного хряща, синовиальной оболочки и синовиальной жидкости, включающее ряд биохимических тестов: определение %-го содержания воды в ткани, количества уроновых кислот (УК) [7] в экстрактах и протеолизатах ткани, определение сульфатной серы [8] (сульфатированных ГАГ - для синовиальной жидкости), нуклеиновых кислот, активности лизосомальных ферментов [9,10], электрофоретическое разделение ГАГ. Математическая обработка полученных данных заключалась в вычислении среднего значения выборки, доверительного интервала и уровня достоверности различий одноименных показателей, с принятием вероятности p , равной 0,05 [6]. Достоверность различий результатов в сравниваемых группах оценивали с помощью парных и непарных непараметрических критериев: критерия Т (парный критерий Вилкоксона) и критерия Лямбда, для чего использовали программу SST на языке Бейсик, разработанную в РНЦ "ВТО". Наличие связи между показателями метаболизма протеогликанов (ПГ) и активностью лизосомальных ферментов оценивали коэффициентом ранговой корреляции по Спирмену.



Рис. 2. Схема выделения ГАГ из ткани.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии проведенных нами исследований по изучению качественного состава ГАГ в синовиальных тканях интактных животных было показано, что в суставном хряще и в синови-

альной оболочке популяция гликозаминогликанов состоит из хондроитинсульфатов, кератансульфата и гиалуроновой кислоты (рис. 3). Особенности биохимического строения ГАГ сустав-

ных тканей состоят в разном количественном отношении и гетерогенности ГАГ по степени сульфатирования.

Во второй серии экспериментальных животных отмечались макроскопические изменения в суставном хряще коленного сустава иммобилизованной конечности (ИК). В суставном хряще контралатеральной конечности (КК) эти изменения были выражены в меньшей степени. Макроскопические изменения суставной поверхности являются следствием нарушения архитектуры хряща и структуры основных его компонентов. Результаты исследований биохимического состава хряща и синовиальной оболочки приведены на рис. 4.

Значительное уменьшение концентрации уроновых кислот (УК), отмечены в хряще ИК и КК. В хряще ИК концентрация УК снижалась на 75%, а в КК-на 50% ($p < 0,05$).

В синовиальной оболочке количество уроновых кислот значимо снижалось в ИК и несущественно - в КК (на 36 и 14% от нормы соответственно).

Уменьшение содержания ПГ в тканях сопровождалось изменением их агрегации в синовиальной оболочке. В синовиальной оболочке интактных собак доля слабосвязанных ГАГ составляет 25,2%. В ИК и КК нарушение агрегации происходит прямо противоположным образом: в опытной конечности увеличивается доля слабосвязанных ГАГ (34,4%), а в КК (24,6%) - уменьшается.

Объективный показатель синтетической активности клеток - ДНК/РНК - снижался в тканях обеих конечностей. Максимальные изменения претерпевал хрящ ИК, в котором этот показатель составлял всего 43,9% от нормы ($p < 0,05$).

Следует отметить, что при иммобилизации

конечности в ткани хряща происходит увеличение активности ферментов лизосом (рис. 5).

По данным проведенных нами исследований в синовиальной жидкости иммобилизованных суставов увеличивается электрофоретическая подвижность гиалуроновой кислоты, возрастают значения активности гиалуронидазы и гексозидазы. Электрофоретические исследования синовиальной жидкости коленных суставов собак с моделью деформирующего артроза обнаружили в ней дополнительную фракцию сульфатированных гликозаминогликанов, идентифицированную нами как кератансульфат (рис. 6).

Результаты биохимических тестов в группе животных с удлинением голени представлены следующим образом (рис. 7): в прямоугольной системе координат, где ось абсцисс представляет собой значения количества уроновых кислот, а ось ординат - % слабосвязанных ГАГ от их общего количества, были отложены значения 10 наблюдений в группе интактных собак. Объем выборки достаточен, чтобы определить границы множества, описывающего эти показатели в физиологических условиях. При различных сроках удлинения эти показатели либо принадлежали к другому множеству (т.е. отличались от физиологических значений), либо проецировались на него (т.е. существенно не отличались).

Для выяснения характера взаимодействий в системе фермент-субстратный комплекс был проведен корреляционный анализ связи общего количества ПГ, степени агрегированности ПГ (% слабосвязанных ГАГ) и активности лизосомальных ферментов: катепсина Д, β -N-ацетилглюкозаминидазы и гиалуронидазы. Результаты расчета коэффициента ранговой корреляции приведены на рис. 8.

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам наших исследований выявили следующие закономерности: наиболее выраженные изменения происходят в хряще ИК, а именно: значительно уменьшается отношение РНК/ДНК, что свидетельствует о снижении биосинтетической функции хондроцитов. Очевидно, что сочетание двух процессов - снижение синтеза ПГ и усиление разрушения ПГ ферментами приводит к снижению их содержания в хряще, что иллюстрируется уменьшением количества УК. Поскольку одной из функций ПГ является удержание интерстициальной воды в ткани, закономерным представляется и снижение степени гидратированности суставного хряща. Возрастание более чем в 2 раза отношения сульфатов к УК показывает возрастание количества сульфатированных ГАГ, что характерно для ПГ дегенеративно измененного сус-

тавного хряща. В синовиальной оболочке не изменяется степень гидратированности, изменение агрегации ПГ происходит с увеличением доли последних, слабосвязанных с матриксом; возрастания количества сульфатированных ГАГ не происходит. Но показатели биосинтетической активности и количество УК также снижаются. Имеют место содружественные реакции биохимических изменений, как в опытной, так и в контралатеральной конечности. Процессы имеют ту же направленность, несмотря на то, а скорее всего именно вследствие того, что происходит перераспределение функционирования конечностей в условиях обездвиживания.

Активность гиалуронидазы практически не определяется в суставном хряще. Возможно, гиалуронидаза секретируется в синовиальную жидкость, поскольку именно в ней значительно

увеличивается активность этого фермента. Но механизм данного процесса не ясен.

По результатам расчета коэффициентов выявили следующие закономерности: - во всех наблюдениях коэффициент корреляции общего количества ПГ с активностью гиалуронидазы имел обратную связь, а с катепсином Д - прямую. Возможно, это объясняется тем, что увеличение активности катепсина Д отражает сдвиг метаболизма ПГ в сторону синтеза белкового кора - выявлена тесная связь агрегированности ПГ (выраженной в % слабосвязанных ГАГ) с активностью β -N-ацетилглюкозаминидазы для синовиальной оболочки обеих конечностей суставного хряща оперированной конечности. Очевидно, при развитии патологического процесса в хряще и в синовиальной оболочке изменение степени агрегированности происходит за счет появления олигосахаридных последовательностей деструктурированных ГАГ, тогда как деградация матрикса связана с возрастанием активности гиалуронидазы и катепсина Д. Однако, усиление протеолиза может вызывать сдвиг метаболизма в сторону увеличения синтеза белкового кора ПГ, без нарушения соотношения катаболических и анаболических процессов. Увеличение активности протеолитических ферментов, и катепсина Д в том числе (в наших исследованиях именно он наиболее значительно активируется в тканях) приводит к появлению в синовиальной жидкости большого количества

белка. Появление в синовии фракций сульфатированных ГАГ - кератансульфата - закономерно, т.к. именно кератан сульфат присутствовал во фракции слабосвязанных ГАГ из тканей хряща и синовиальной оболочки, как было показано в наших исследованиях.

Нельзя не обратить внимание на однонаправленность биохимических изменений в двух экспериментальных сериях, различных по биомеханическим условиям изменения функционирования сустава. В последовательности дезагрегации ПГ и их "утечки" из матрикса, процессы, происходящие в суставном хряще и синовиальной оболочке суставов экспериментальных животных однонаправлены. В группах собак с удлинением голени наиболее выражен процесс дезагрегации ПГ, а при иммобилизации конечности - уменьшение общего количества последних. Поскольку активность гексозидазы имеет тесную корреляционную связь со степенью агрегированности ПГ, определение активности этого фермента информативно для оценки деструктурированности ПГ матрикса, а определение катепсина Д и гиалуронидазы отражает следующую стадию развития патологического процесса. Оценивая информативность использованных нами тестов для синовиальной жидкости, следует отметить, что деструктивные процессы в суставе содержание в ней белка отражает в большей степени, нежели количество уроновых кислот.

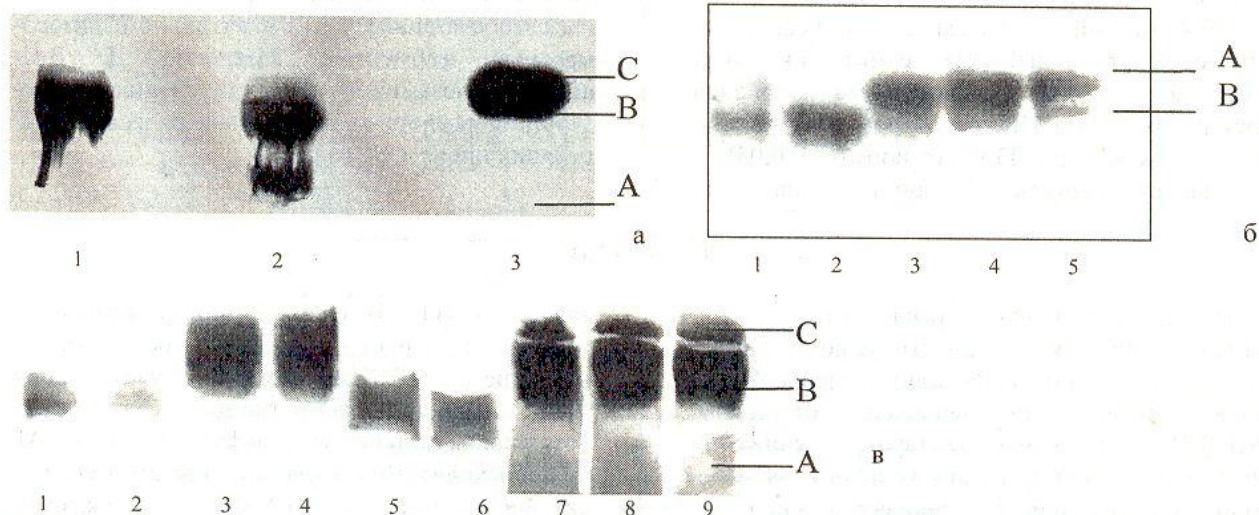


Рис. 3

а) Электрофореграмма экстрактов ГАГ суставного хряща коленных суставов intactных собак в 1% агарозном геле, 0,1 М ВаАс буфер, pH 8,0. А - ХС, В - КС, С - ГК. 1, 2 - экстракт ГАГ суставного хряща, 3 - ХС.

б) Электрофореграмма экстрактов и протеолизатов ГАГ суставного хряща коленных суставов intactных собак в 1% агарозном геле, 0,1 М ВаАс буфер, pH 8,0, А - ХС, В - КС. 1, 2 - экстракт ГАГ, 3, 4, 5 - протеолизат ГАГ суставного хряща

в) Электрофореграмма экстрактов и протеолизатов ГАГ синовиальной оболочки коленных суставов intactных собак в 1% агарозном геле, 0,1 М ВаАс буфер, pH 8,0, А - ХС, В - КС, С - ГК. 1, 2, 5, 6 - экстракт ГАГ, 3, 4, 7, 8, 9 - протеолизат ГАГ синовиальной оболочки.

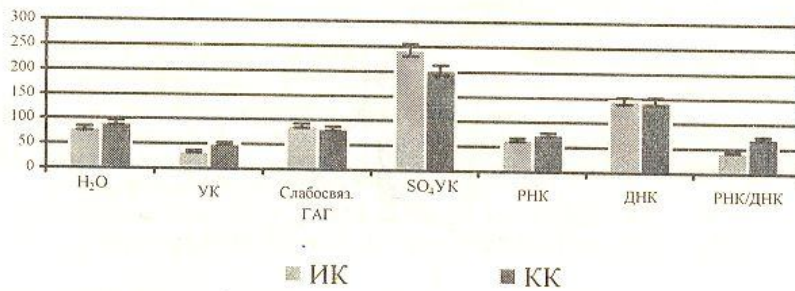
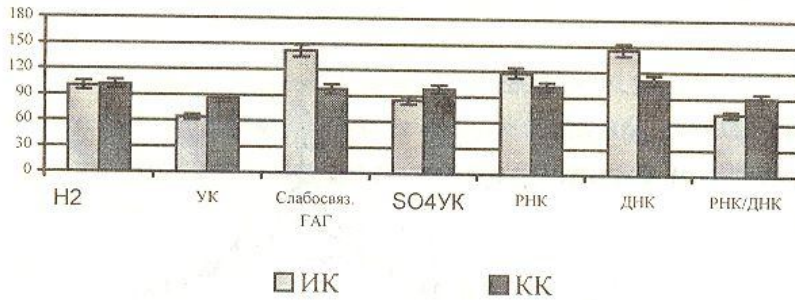
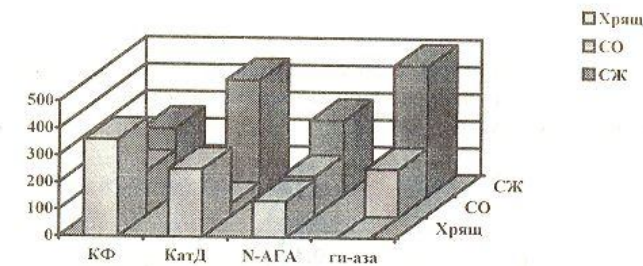


Рис. 4

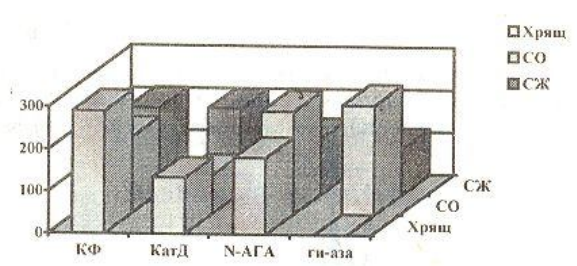
а) Основные биохимические компоненты суставного хряща иммобилизованной и контралатеральной конечности (в % от нормы)



б) Основные биохимические компоненты синовиальной оболочки иммобилизованной и контралатеральной конечности (в % от нормы)



а) иммобилизованная конечность



б) контралатеральная конечность

Рис. 5. Активность ферментов лизосом в тканях коленного сустава и синовиальной жидкости при иммобилизации сустава 42 дня.

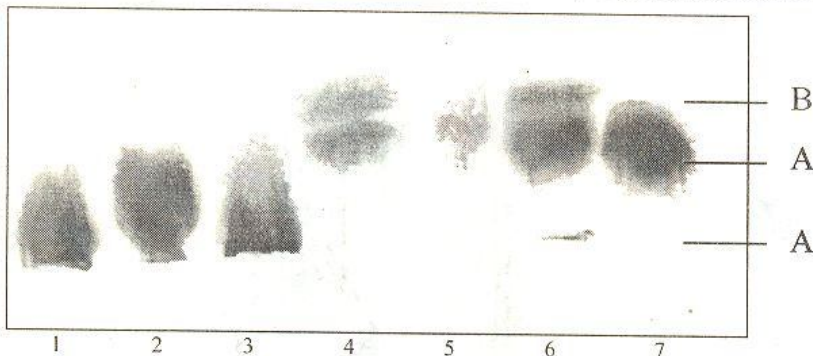


Рис. 6. Электрофореграмма ГАГ синовиальной жидкости коленных суставов интактных собак и собак с иммобилизацией в 1% агарозном геле, 0,1 М ВаАс буфер, pH 8,0. В - КС, С - ГК.

1 - ГК, 2, 3 - ГАГ синовиальной жидкости коленных суставов интактных собак, 4, 5, 6, 7 - ГАГ синовиальной жидкости коленных суставов собак с иммобилизацией.

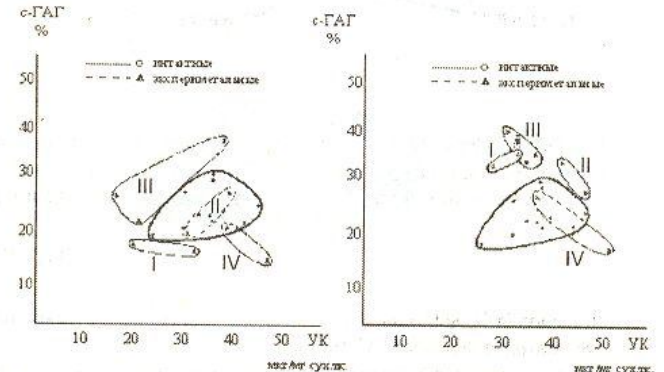
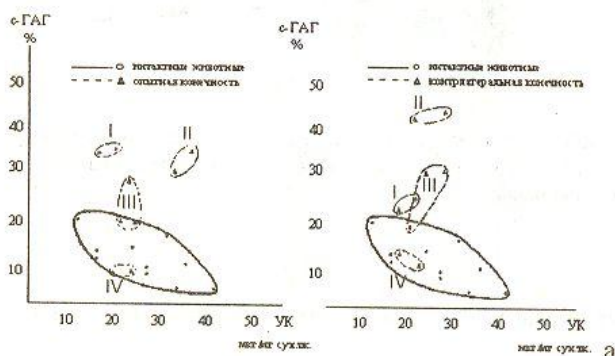


Рис. 7 а) График изменения общего количества и % слабосвязанных ГАГ в суставном хряще опытной (слева) и контралатеральной (справа) конечности. I, II, III, IV - группы экспериментальных животных
б) График изменения общего количества и % слабосвязанных ГАГ в синовиальной оболочке опытной (слева) и контралатеральной (справа) конечности. I, II, III, IV - группы экспериментальных животных

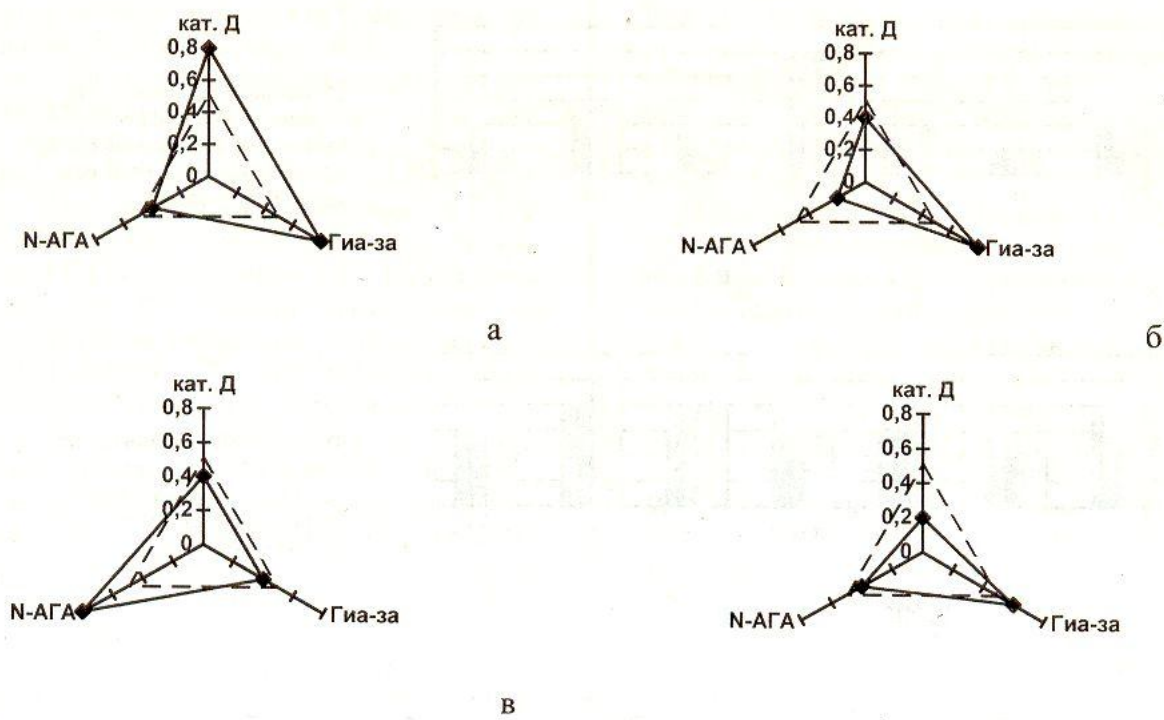


Рис. 8-1. Коэффициенты корреляции (по Спирмену) для показателей суставного хряща собак с удлинением голени: а - общее количество ПГ (опытная конечность), б - общее количество ПГ (контралатеральная конечность), в - % слабосвязанных ГАГ (опытная конечность).

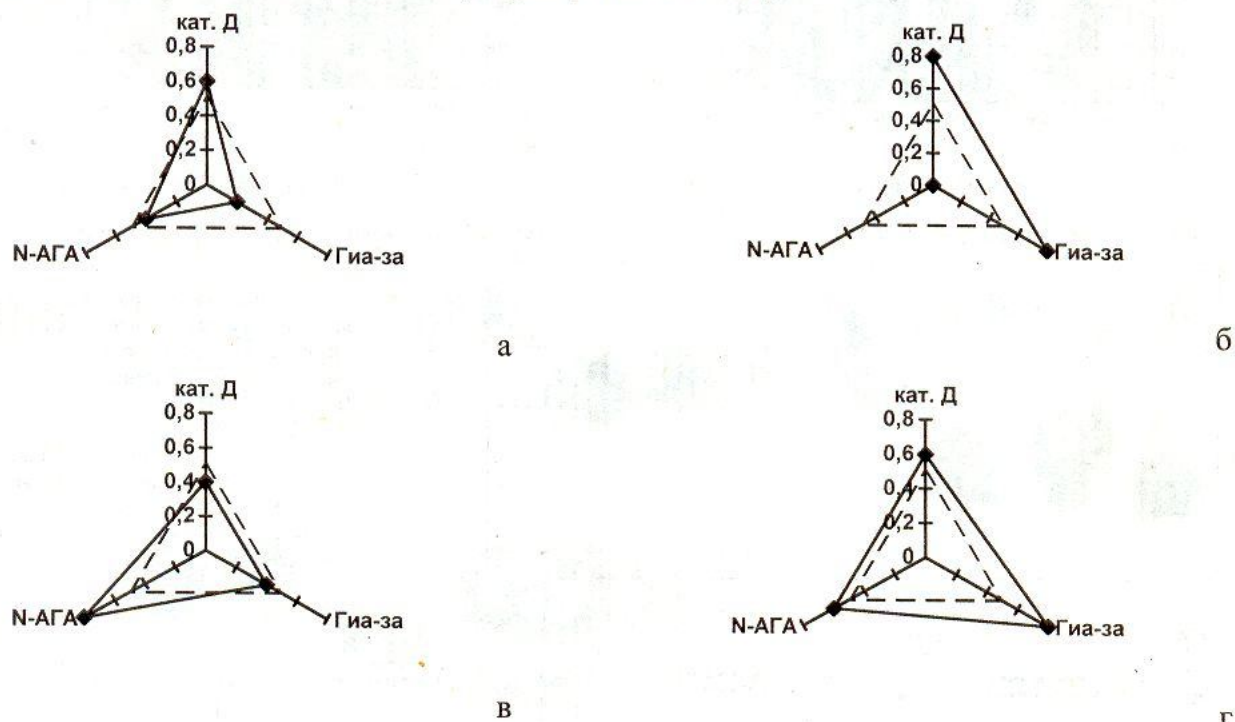


Рис.8-2. Коэффициенты корреляции (по Спирмену) для синовиальной оболочки собак с удлинением голени: а - общее количество ПГ (опытная конечность), б - общее количество ПГ (контралатеральная конечность), в - % слабосвязанных ГАГ (опытная конечность).

ЛИТЕРАТУРА

1. Жаденов И.И., Пастель В.Б. Обменные процессы в суставном хряще в норме (возрастной аспект) и при патологии // Ортопед. травматол. 1982. - №3. - С. 65-70.
2. Итоги длительного изучения механизмов дегенерации суставного хряща при первичном деформирующем артрозе / М.Г. Астапенко, Н.М. Фильчагин, В.А. Дуляпин и др. // Терапевтический архив. - 1982. - Т. LIV, № 6. - С. 115-121.
3. Грачева Л. И., Десятниченко К. С. Изменения в структуре глико-заминогликанов и упругих свойствах хряща собак в условиях иммобилизации, перелома и удлинения конечности по Илизарову // Сб. науч. тр. ВКНЦ "ВТО". - Курган, 1990. - Вып. 15. - С. 155-162.

4. Косягин Д.В. Модификация метода выделения фракций протеогликанов из ткани хряща // Укр. Биохим. журнал. – 1981. - Т. 53, N 5. - 90-92с.
5. Зимица Н.П. Химическая характеристика и биологические свойства протеогликанов животных тканей, обладающих активностью кейлонов: Дис...канд. биол. наук. - Новосибирск, 1987. - 193 с.
6. Хаксли Н.Г. Корреляционный анализ. Пер. с англ. - М., 1981. - 89с.
7. Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reactions // Annal. Biochem. – 1962. - Vol. 4, N 4. - 330-334p.
8. Десятниченко К. С., Абрамова Г. Д. Способ определения микроколичеств сульфатной серы в растворе озоленной кости. - Рац. предложение КНИИЭКОТ N43 от 7.08.1985г.
9. Tissue proteinases/ Eds. A.J. Barrett, J.T.Dingle. - Amsterdam, 1971. - 109 p.
10. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. - М.: Наука, 1976. - 378с.

Рукопись поступила 05.12.97.

Вниманию ортопедов-травматологов, руководителей медицинских учреждений и организаций, осуществляющих торговлю медицинскими приборами и инструментами



Опытный завод РНЦ "ВТО" имени академика Г.А. Илизарова предлагает аппарат Илизарова, полукольца и стержни, которые выполнены из современных композиционных материалов (углепластик), обеспечивающих:

- рентгенопрозрачность
- прочность, не уступающую стальным
- снижение веса в 3 раза

Комплектуем заказы на 1998 год.

Заказы направлять по 640005 г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6, опытный завод РНЦ
адресу: "ВТО"

Телефоны для справок: (35222) 3-50-54 - директор завода Воронцов Валерий Павлович
3-53-40 - отдел сбыта

Рентгенограмма аппарата из металлических и углепластиковых колец и стержней	Компоновка аппарата с деталями из углепластика
