

ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СУСТАВНОГО ХРЯЩА И СПОСОБ ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

К.С.Десятниченко, С.Н.Лунова, А.А.Ларионов, С.Н.Асонова

DEGENERATIVE AND DYSTROPHIC CHANGES OF ARTICULAR CARTILAGE AND A TECHNIQUE OF THEIR PHARMACOLOGICAL CORRECTION

K.S.Desiatnichenko, S.N.Lunyova, A.A.Larionov, S.N.Asonova

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

Были изучены вязкоупругие свойства и химический состав суставного хряща собак, которым накладывали аппарат Илизарова на голень, с внутриапартулярным введением препарата-хондропротектора и без него. В хряще оперированных и контрлатеральных конечностей развиваются изменения, заключающиеся в снижении податливости, увеличении степени минерализации, нарушении соотношений между мономерными и агрегированными протеогликанами внеклеточного матрикса. Изменения касаются также состава гликозаминогликанов, являющихся ингредиентами этих протеогликанов, появляются не свойственные нормальному хрящу типы коллагена. Экспериментальная апробация предложенного препарата стимулон-3, показала, что его применение в виде внутриапартулярных инъекций практически полностью восстанавливает механические свойства суставного хряща при его дегенеративных поражениях.

Ключевые слова: коленный сустав, дегенеративные поражения хряща, протеогликаны, хондропротектор.

Viscoelastic properties and chemical composition of articular cartilage was studied in the dogs, which were subjected to the Ilizarov apparatus application to a leg, with intraarticular infusion of chondroprotector and without it. In the cartilage of operated and contralateral limbs changes developed, consisting in decrease of pliability, increase of mineralization degree, break of ratios between monomeric and aggregated proteoglycans of cellular matrix. Experimental evaluation of the proposed preparation - stimbone-3 - demonstrated, that its use as intraarticular injections almost completely restored mechanical properties of articular cartilage in case of its degenerative involvements.

Keywords: the knee, degenerative cartilaginous involvements, proteoglycans, chondroprotector.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение причин и закономерностей развития посттравматических дегенеративно-дистрофических изменений в суставном хряще является актуальной задачей, поскольку их возникновение, в том числе и при использовании метода управляемого чрескостного остеосинтеза, часто осложняет лечение ортопедо-травматологических больных [1,2]. В настоящее время для лечения остеоартроза наиболее популярны хондропротекторные препараты, такие, как румалон, артепарон, представляющие собой дериваты гликозаминогликанов (ГАГ) в той или иной форме [3,4]. Основным свойством препаратов-хондропротекторов является целенаправленное влияние на метаболизм патологически измененной хрящевой ткани, основным действующим компонентом - глюкозамин. Кроме этого, для профилактики развития и лечения остеоартроза предложены несколько видов биологических заменителей синовиальной жидко-

сти, ряд из них - на основе медицинского желатина [5]. Кроме того, имеются сведения о стимулирующем влиянии коллагена на образование соединительной ткани [6].

Физиологически активные вещества - гормоны, факторы роста (ФР) и нейромедиаторы - вызывают неотступный интерес исследователей всего мира. Недавние исследования в нескольких лабораториях показали, что ФР, депонированные в костной ткани, могут быть использованы как для модуляции костеобразования и активности остеобластов, так и для стимулирования пролиферации хондроцитов [7]. Однако механизм такого действия ФР остается не изученным до настоящего времени. Наши наблюдения показали, что через три недели, после подкожного введения белков с гипогликемическими свойствами (вероятно - инсулинподобных ФР) растущим мышам в дозе 0,5 мг/кг массы тела животного, наблюдается прирост массы

гиалинового хряща за счет усиления его продукции [8].

Создание препарата обладающего хондропротекторным, лубрикационным и обезболивающим действием продолжило исследования по конструированию фармпрепаратов, пред-

ставляющих собой композиции ингредиентов минеральной фазы и органического матрикса костной ткани [9], с серийным названием стимубон - от Stimulator from Bone. Он получил название стимубон-3.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Были исследованы химический состав и вязкоупругие свойства гиалинового хряща коленных суставов 19 беспородных собак, из которых в 1-ой серии опытов 6 животным аппарат Илизарова из 4 кольцевых опор накладывали на голень; во 2-ой серии 5 собакам, на 14-й день после аналогичной операции в условиях асептики в полость пораженного сустава дважды в неделю вводили по 3 мл препарата на протяжении 3 недель; 8 животных составили интактный контроль. В ходе последующего анализа изучали макроскопическое состояние суставных поверхностей, исследовали вязкоупругие свойства и химический состав хряща коленного сустава оперированной и контрлатеральной конечности, сравнивали их с показателями хряща интактных собак. С этой целью мы измеряли податливость хряща при помощи прибора и методики, ранее нами описанных [10]. Ткань прецизионно взвешивали на электронных аналитических весах Tekator (Sartorius, ФРГ), лиофильно высушивали на установке Lyph Lock 4,5 (Labconco, США) и, повторно взвешивая, определяли в пробе содержание воды. В образцах высушенного хряща после жесткой деградации влажным озолением или относительно мягкого кислотного гидролиза [11] определяли основные компоненты минеральной фазы и внеклеточного органического матрикса: кальций, неорганический фосфат, сульфат, гидроксипролин [12], гексозамины [13], уоновые кислоты [14], гексозы [15], а

также показатели клеточной активности хондроцитов - содержание нуклеиновых кислот [16]. Кроме того, фракционировали протеогликаны (ПГ) по величине образуемых ими супрамолекулярных агрегатов, используя различия в экстрагируемости в зависимости от состава экстрагирующего буферного раствора и времени экстрагирования [17], и определяли содержание каждой из выделенных фракций анализом на уоновые кислоты. 4-ю - нерастворимую - фракцию подвергали папаиновому протеолизу, освобожденные из связи с коровыми белками гликозаминогликаны (ГАГ) осаждали цетавлоном и разделяли посредством анионообменной хроматографии на колонке 15 x 2 см с ДЭАЭ-сефадексом А-25 (Pharmacia, Швеция). Для идентификации выделенных хроматографий соединений во фракциях, собранных на коллекторе и объединенных согласно результатам денситометрии элюата, определяли содержание уоновых кислот, гексозаминов, гексоз и сульфата. В надосадочной жидкости определяли количество и тип коллагена [18], используя катионообменную хроматографию на колонке 10 x 1 см с КМ-трисакрилом М (IBF, Франция). Для градиентного элюирования, денситометрии элюата и сбора фракций использовали комплекс приборов для жидкостной хроматографии низкого давления, производимый Pharmacia-LKB (Швеция).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполненные исследования показали, что при наложении аппарата внешней фиксации на голень (1-я серия эксперимента) на фоне слабо выраженных макроскопических изменений суставной поверхности происходит значительное снижение механических свойств хряща. Макроскопически хрящ коленного сустава (ХКС) леченой конечности не имел отличий от интактного: толщина слоя хряща, покрывающего эпифиз большеберцовой кости, не изменена, суставные поверхности гладкие, блестящие, жемчужно-серого цвета. Механические свойства и гидратированность ХКС леченого сустава существенно отличаются от нелеченного, приближаясь к таковым у нормального хряща (рис.1).

При изучении состава хряща коленных сус-

тавов животных 2-ой серии эксперимента было обнаружено статистически достоверное увеличение концентрации гексуроновых кислот (ГУК) на 18,4% в ХКС леченой конечности, в ХКС аналогично оперированной конечности без введения препарата снижение концентрации этого показателя составило 30,4%. В ХКС контрлатеральных конечностей обеих серий эксперимента содержание ГУК было одинаковым и составило 76,4% от нормы. При изучении биосинтетических и пролиферативных потенций выяснилось, что в ХКС животных 1-ой серии эксперимента концентрация ДНК была несколько снижена по сравнению с нормой, тем не менее, отношение РНК/ДНК, обратно пропорционально характеризующее пролиферативный потенциал ткани,

значительно снижалось. Отсюда можно заключить, что при нарушении стереотипа движений в суставе и сопутствующей скелетной травме в условиях управляемого чрескостного остеосинтеза, как и при некоторых других экспериментальных воздействиях, снижается количество клеток, которое сопровождается повышением пролиферативной активности оставшихся хондроцитов. У животных 2-й серии эксперимента достоверных отличий концентрации ДНК по сравнению с интактными животными не наблюдается, однако было обнаружено статистически достоверное увеличение содержания РНК в ХКС леченой конечности. Отношение РНК/ДНК в ХКС оперированной леченой конечности составило $9,89 \pm 0,45$, что на 28% ($P < 0,05$) превышает норму. Все эти данные говорят о том, что при незначительном уменьшении пролиферативной активности хондроцитов в клетке усиливаются биосинтетические процессы (рис.1).

Итак, использование препарата стимулон-3 приводит к значительной коррекции нарушений состава и свойств ХКС как удлиняемой, леченой так, хотя и в меньшей мере, контрлатеральной конечности, что позволило сделать вывод о наличии хондротропного действия препарата. Этот вывод был подтвержден и результатами исследования степени агрегации протеогликанов (ПГ). Распределение фракций ПГ по степени агрегирования в хряще коленных суставов показало увеличение доли мономеров и ПГ низкой степени агрегирования, уменьшения в 2 раза доли ПГ, входящих в состав суперагрегатов

и прочно связанных с коллагеном, в группе животных с наложением аппарата на голень. В группе животных с внутриаппаратным введением препарата, доля ПГ, входящих в состав суперагрегатов, уменьшается в контрлатеральной конечности более чем в 1,5 раза, в то время как уменьшение доли ПГ данной группы в матриксе хряща оперированной конечности статистически не достоверно (рис.2).

При изучении степени однородности коллагена хрящей животных 1-ой серии опытов, нами получен дополнительный пик, не свойственный здоровой хрящевой ткани, но обнаруженный в протеолизате костной ткани, и являющийся, несомненно, коллагеном типа I, а так же некоторое увеличение пика минорных коллагенов. В ХКС экспериментальных животных 2-й серии нами так же обнаружен дополнительный пик коллагена, который наблюдался в ХКС нелеченой конечности. Как и в случае наложения аппарата ЧДО на голень, пик элюировался при 0,65 М концентрации NaCl и занимал площадь, равную 2,3 % от совокупной площади коллагеновых фракций. В ХКС оперированной и леченой конечности аналогичный пик коллагена нами не обнаружен (рис.3). Вместе с тем присутствие коллагена типа I может иметь большое значение в патогенезе заболеваний суставов. Более низкое содержание остатков оксализина в р-цепях коллагена может приводить к ослаблению связей между остатками полисахаров коллагена и ПГ матрикса хряща, т.е. способствовать его дальнейшей деградации [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение двигательного стереотипа и содружественные реакции в тканях неоперированных фрагментов скелета приводят к изменениям и в структуре и в составе суставного хряща конечности, контрлатеральной оперированной. При минимальном объеме вмешательства (наложение аппарата на голень) эти изменения выражены даже больше, чем в оперированной конечности. Вместе с тем, у нас есть основания считать, что при подобных изменениях хрящ как оперированной, так и контрлатеральной конечности сохраняет высокую способность к реституции: мало изменяются показатели клеточной активности (нуклеиновых кислот) хондроцитов, изменения во внеклеточном матриксе - соотношения между сульфатированными и несульфатированными ГАГ - подобны тем, что наблюдаются на ранних стадиях развития хряща [20]. Ранее на аналогичной описанной здесь модели было показано, что в условиях иммобилизации сустава аппаратом Илизарова хондроциты сохраняют способность к пролиферации [21]. На основании приведенных в настоящей работе

данных мы считаем, что при выполнении ортопедических вмешательств с нарушением стереотипа движений в суставе и с сопутствующей общей метаболической реакцией на скелетную травму необходимо учитывать возможность существенных изменений в суставном хряще и применять весь существующий арсенал средств для их профилактики. Разработанный препарат стимулон-3, включающий неколлагеновые белки с гипогликемическими свойствами, коллаген и дериваты ГАГ, представляет собой композицию биологически активных компонентов костной ткани. Экспериментальная апробация предложенного препарата показала, что его применение в виде внутриаппаратных инъекций практически полностью восстанавливает механические свойства суставного хряща при его дегенеративных поражениях. Указанный эффект достигается вследствие изменения активности биосинтетических процессов (увеличение индекса РНК/ДНК) и структуры внеклеточного матрикса, которая определяет биомеханические свойства суставного хряща.

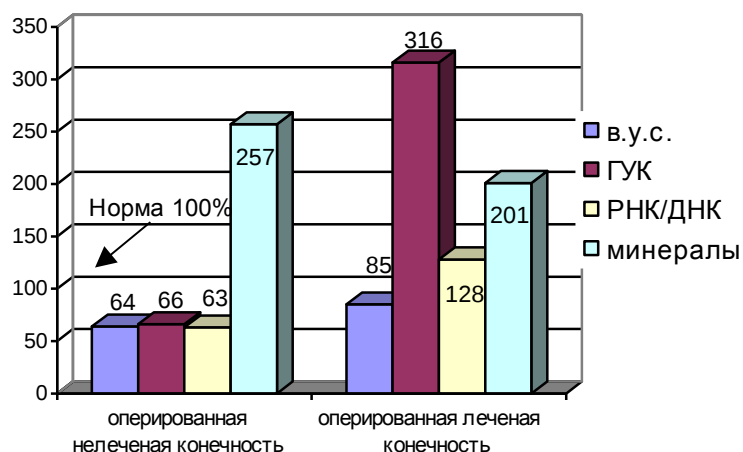


Рис. 1. Показатели свойств и состава хряща коленных суставов собак с наложением аппарата на голень.

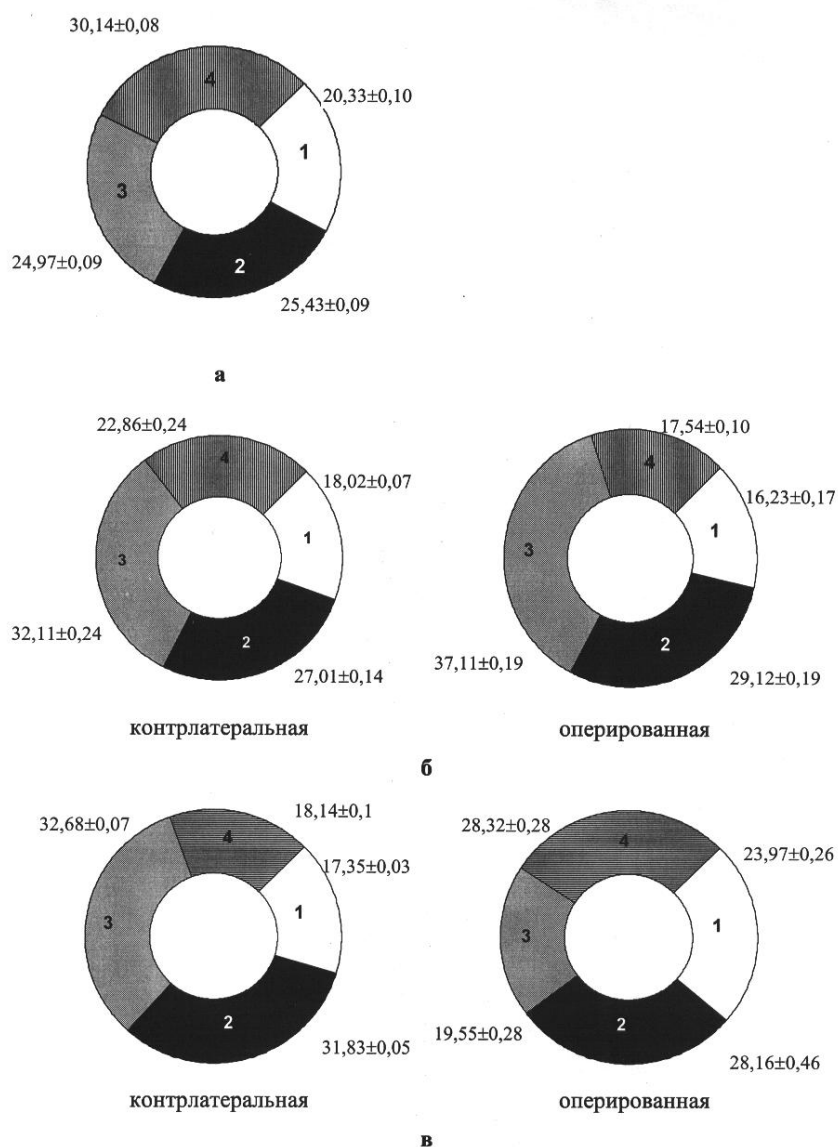


Рис. 2. Распределение фракций протеогликанов по степени агрегации в суставном хряще собак:

а – intactные животные;
 б – животные с наложением аппарата на голень;
 в – животные с наложением аппарата на голень, после внутриапуляруного введения препарата-хондропротектора.
 1 – мономеры ПГ с короткими цепями ГАГ;
 2 – мономеры ПГ с длинными цепями ГАГ;
 3 – агрегаты ПГ, не связанные с коллагеном;
 4 – агрегаты ПГ, прочно связанные с коллагеном.

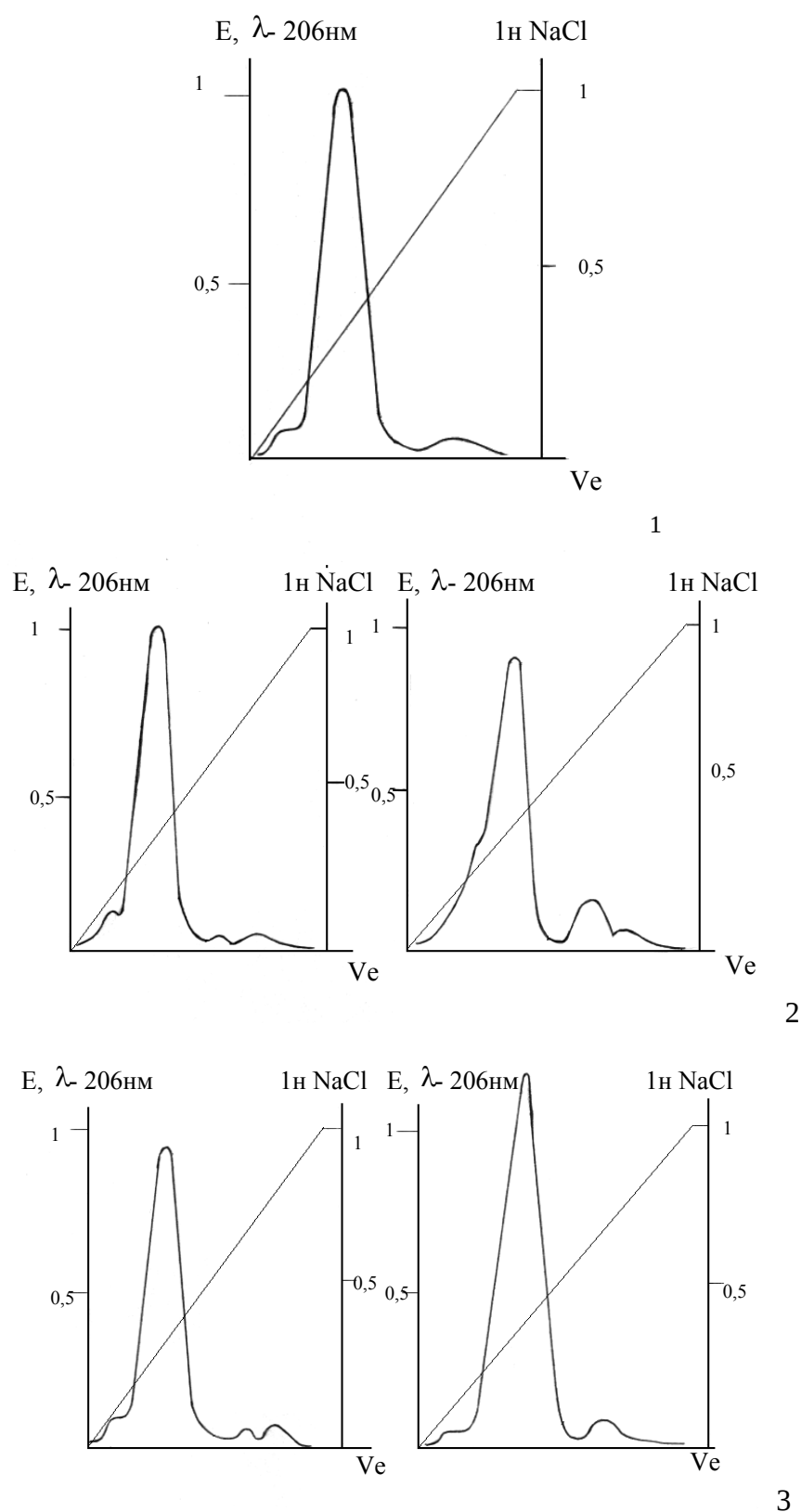


Рис. 3. Хроматографические профили коллагена суставного хряща собак, после катионообменника. 1 – интактные животные; 2 – животные с наложением аппарата на голень; 3 – животные с наложением аппарата на голень, после внутриакулярного введения препарата-хондропротектора. А – контрлатеральная конечность; б – оперированная конечность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Астапенко М.Г., Баятова В.К. Современное состояние проблемы деформирующего остеоартроза // Ревматология. - 1984. - N 2. - С. 61-64.
2. Веникова М.С., Череш Г.Н. Повреждение суставного хряща и развитие паннуса на ранней стадии // Деструкция суставов: Тез. докл. 16 симпозиума ESOA. - Сочи, 1987. - С. 176-176.
3. Зиненко Т.Н. Глюкозамин в физиологической регенерации суставного хряща / VII Республиканская школа: Биология опорно-двигательного аппарата. Харьков, 8-10 июня 1994г. // Ортопед. травматол. - 1994. - N 4. - С. 76.
4. Зиненко Т.Н. Особенности экспериментального изучения синтетических и природных хондропротекторов / VII Республиканская школа: Биология опорно-двигательного аппарата. Харьков, 8-10 июня 1994 г. // Ортопед. травматол. - 1994. - N 4. - С. 77-78.
5. Пашков А.Е. Биологические заменители синовиальной жидкости для профилактики и лечения артроза (экспериментальное исследование) // Актуальные вопросы биологии опорно-двигательного аппарата: Материалы VIII школы стран СНГ (12-14 июня 1996). - Киев, 1996. - С. 74.
6. Bruckner P., van der Rest M. Structure and function of cartilage collagens // Microscopy Research and Technique. - 1994. - N.28. - P.378-384.
7. Froach E.R., Schmid C., Zangger I., Schoenle E., Eigenmann E., Zapf J. Effects of IGF/somatomedins on growth and differentiation of muscle and bone // J.Anim.Sci. - 1986. - N.63. - S.2. - P.57-75.
8. Выделение из костной ткани и биотестирование в эксперименте низкомолекулярных полипептидов с регуляторной функцией / Десятниченко К.С., Лунова С.Н., Асонова С.Н. и др. // Тез. докл. XXIV областной научно-практической конференции. - Курган, С. 82-83.
9. Шевцов В.И., Десятниченко К.С., Устюжанина О.Б. и др. Конструирование и экспериментальная апробация фармпрепаратов из костной ткани // Гений ортопедии, 1997. - N 4. - С.6-12.
10. Десятниченко К.С. Биохимические исследования зрелой костной ткани и дистракционного регенерата кости. Информационное письмо. // Курган. - 1992. - 13 С.
11. Berman J., Loxly R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. // Anal. chem. - 1963 - Vol.35 - N.12 - p.1961-1965.
12. Elson I., Morgan W. Colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. // Biochem.J. - 1933 - N.27 - p.1824-1831.
13. Десятниченко К.С., Грачева Л.И., Кузнецова Л.С. Функциональные биохимические исследования в клинике ортопедии и травматологии. Методические рекомендации. // Курган. - 1990. - 27 С.
14. Holt C. The method for the determination of glycoproteins. // Klin. Wschr. - 1954. - Vol.35. - P.66-67.
15. Збарский И.Б., Дебов С.С. Химия и биология нуклеиновых кислот. // Л. - 1968 - с.80-81.
16. Косягин Д.В. Протеогликаны суставного хряща человека в норме и при возрастных дегенеративных изменениях. // Вопросы мед. химии. - 1982. - Т. 28. - Вып. - 4. - С.68-71.
17. Симхович Б.З., Слуцкий Л.И. Молекулярная гетерогенность коллагена кожи белых крыс в раннем постнатальном периоде. // Вопросы мед. химии. - 1982. - Т. 28. - Вып. - 4. - С.110-114.
18. Десятниченко К.С., Балдин Ю.П., Дьячков А.Н. Ауто- и паракринная регуляция остеогенеза и кроветворения: Тез. докл. II съезда физиологов Уральского региона (Октябрь, 1990 г.). - Свердловск, 1990. - С. 137-138.
19. Замараева Т.В., Лебедева Д.А. Поперечные ковалентные связи, стабилизирующие коллагеновые структуры в норме и при патологии // Вопр. мед. химии. - 1985. - N. I. - С. 10-23.
20. Бахлыков Ю.Н., Дунаев П.В., Соловьев Г.С. Гистохимические критерии оценки индуктивных свойств хрящевой ткани // Эпителий и соединительная ткань в нормальных, экспериментальных, патологических условиях: Тез. конф. морфологов Сибири. - Тюмень, 1983. - С. 227-228.
21. Грачева Л.И., Ерофеев С.А. Суставной хрящ в условиях варьирования дробности дистракции голени собак по Илизарову // Физиологические механизмы адаптации человека и животных: Тез. докл. 2-го съезда физиол. Уральского региона. - Свердловск. - 1990. - С. 135-136.

Рукопись поступила 31.12.97 г.