



ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ ТКАНЕЙ МЕЖПОЗВОНКОВЫХ ДИСКОВ У БОЛЬНЫХ ИДИОПАТИЧЕСКИМ СКОЛИОЗОМ

Т.В. Русова¹, О.Н. Кулешова², Д.В. Жуков¹

¹Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии

²МНТК «Микрохирургия глаза», Новосибирск

Цель исследования. Анализ количественного и качественного состава гликозаминогликанов межпозвонковых дисков у больных идиопатическим сколиозом.

Материал и методы. Межпозвонковые диски и пластинки роста получены в результате хирургической коррекции деформации позвоночника от 50 больных 12–14 лет с идиопатическим сколиозом III–IV степени с вершиной деформации в грудном отделе. В качестве нормы использовался секционный материал судмедэкспертизы (20 образцов). Из тканей анатомически выделяли составные части — пульпозное ядро, фиброзное кольцо и пластинку роста.

Результаты. Установлено, что во всех частях межпозвонковых дисков, как и в пластинке роста, изменяется качественный состав гликозаминогликанов: увеличивается относительное содержание кератансульфата, снижается количество хондроитинсульфата. В гликозаминогликанах появляется значительное количество неацетилированных гексозаминов, снижается относительное содержание сульфатных групп.

Заключение. Отмеченные изменения связаны с нарушением синтеза и процессов модификации цепей гликозаминогликанов.

Ключевые слова: идиопатический сколиоз, межпозвонковые диски, гликозаминогликаны.

GLYCOSAMINOGLYCANS OF INTERVERTEBRAL DISC TISSUES IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC SCOLIOSIS

T.V. Rusova, O.N. Kuleshova, D.V. Zhukov

Objective. To analyze quantitative and qualitative composition of glycosaminoglycans in intervertebral disc tissues in patients with idiopathic scoliosis.

Material and Methods. Intervertebral discs and growth plates were obtained from 50 patients at the age of 12 to 14 years undergoing surgical correction for idiopathic scoliosis of Grade III–IV with apex in the thoracic spine. Autopsy material (20 samples) from forensic medical examination was used as a norm. Nucleus pulposus, annulus fibrosus and growth plate were anatomically separated from tissues.

Results. It was established that qualitative composition of glycosaminoglycans is changed both in all parts of the intervertebral discs and in growth plate. Abundance of keratan sulfate increased and of chondroitin sulfate decreased. A great deal of nonacetylated hexosamines appeared and abundance of sulfate groups reduced.

Conclusion. Revealed changes are related to the disorders in synthesis and processes of chain modification in glycosaminoglycans.

Key Words: idiopathic scoliosis, intervertebral discs, glycosaminoglycans.

Hir. Pozvonoc. 2006;(3):84–87.

Идиопатический сколиоз (ИС) – латеральная деформация позвоночника, развивающаяся у детей в период активного роста. Клинические проявления ИС известны много веков, но до настоящего времени нет четкого понимания механизма патологии. Многие исследователи считают, что изменение структуры тканей межпозвонковых дисков (МПД) значительно влияет на развитие сколиотической деформации [10, 14, 19]. Биомеханические свойства и физиологические функции тканей МПД за-

висят от уникальной структуры и специфических взаимодействий основных компонентов межклеточного матрикса – коллагена и протеогликанов (ПГ), которые вместе с водой составляют 95 % массы ткани.

ПГ – сложные молекулы, состоящие из ковалентно связанных между собой центральной нити белка (кора) и полисахаридных цепей – гликозаминогликанов (ГАГ). Существует огромное разнообразие молекул ПГ, которые различаются количеством и длиной цепей ГАГ на одном белко-

вом коре, составом дисахаридных единиц, чередующихся в ГАГ, и степенью их модификации. Важно отметить, что для каждой ткани характерен специфический состав ГАГ и (или) ПГ, отличающийся тонкой структурой дисахаридных единиц, модификация которых может претерпевать изменения при различных патологиях. Эти изменения приводят к нарушению молекулярных взаимодействий и, следовательно, к нарушению структуры тканей и их функций [11]. Об изменении ГАГ в МПД боль-

ных ИС имеются противоречивые сообщения, авторы которых сходятся в том, что у больных ИС меняется качественный состав ГАГ, но ни один из исследователей химическую структуру этих веществ не рассматривает [2, 4, 9, 13]. Нами найдены существенные изменения ГАГ в пластинке роста (ПР) тел позвонков у больных ИС, затрагивающие количественные и качественные изменения состава и химической структуры полисахаридов [1].

Цель исследования – анализ количественного и качественного состава ГАГ МПД у больных ИС.

Материал и методы

МПД и ПР получены в результате хирургической коррекции деформации позвоночника от 50 больных 12–14 лет с ИС III–IV степени с вершиной деформации в грудном отделе. В качестве нормы использовали секционный материал судмедэксперти-

зы (20 образцов). Из тканей анатомически выделяли ПР и составные части МПД – пульпозное ядро (ПЯ), фиброзное кольцо (ФК).

Ткани обрабатывали раствором папаина с добавлением 0,01 М ЭДТА и 0,005 М цистеина в буфере 0,2 М ацетата натрия pH 5,8 (60 °С, 18 ч, 0,2 мг папаина на грамм сырой ткани). Способ выделения описан нами ранее [1]. Количество хондроитинсульфатов (ХС) определяли по содержанию уроновых кислот [6], кератансульфата (КС) – по содержанию галактозы [17], сульфатированных ГАГ (С-ГАГ) – по реакции с 1,9-диметил-метиленовым голубым [8]; ацетилированные и неацетилированные глюкозамин и галактозамин определяли методами, разработанными S.T. Brownlee et al. [7] и J.L. Reissig et al. [15]. Содержание ГАГ рассчитывали в мкг на мг сырого веса ткани. Кроме того, в тканях определяли содержание воды. Результаты обрабатывали

статистически с применением критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

У больных ИС содержание воды в ПЯ и ФК снижается примерно на 10–15 %. В ПР это снижение более значительно – до 20 %. Известно, что ПГ тканей МПД содержат преимущественно ХС и КС. Поэтому количество именно этих ГАГ позволяет судить о содержании ПГ в ткани.

На рис. показаны изменения содержания ГАГ в тканях МПД и ПР. Во всех тканях наиболее значительно снижается содержание ХС и С-ГАГ. Степень выраженности этих изменений убывает в ряду ПЯ → ФК → ПР. У больных ИС в тканях относительное содержание КС увеличивается в 1,5–2 раза, соответственно снижается количество ХС. Наиболее значительно такие изменения происходят в ПЯ и ПР – изначально высокое

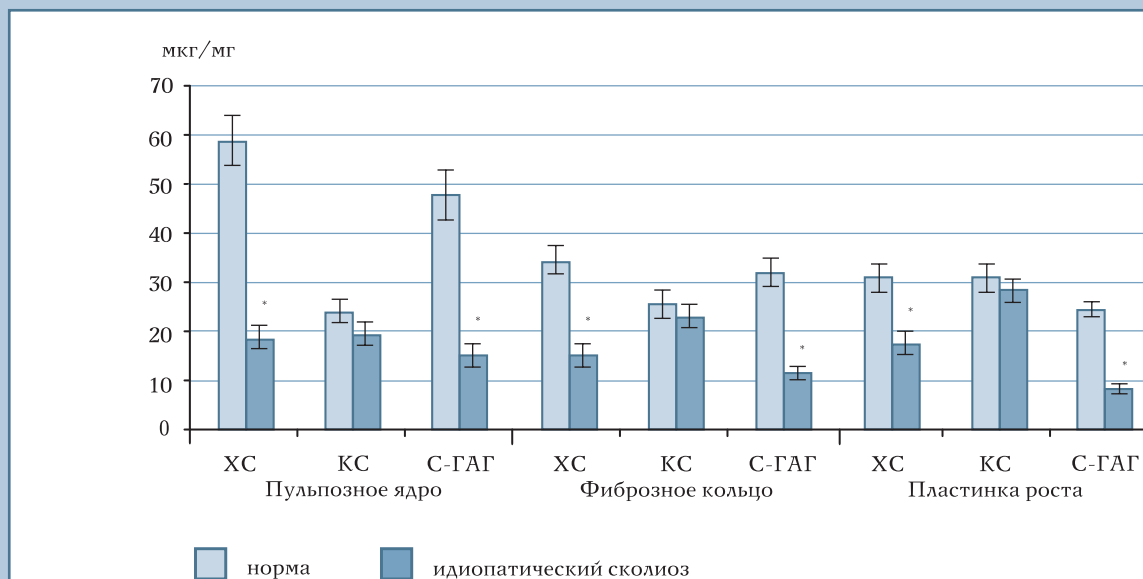


Рис.

Содержание гликозаминогликанов (мкг/мг сырого веса ткани) в межпозвонковых дисках и пластинке роста в норме и при идиопатическом сколиозе: ХС – хондроитинсульфат; КС – кератансульфат; С-ГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны; * $P < 0,05$

содержание ХС сменяется высоким уровнем КС. Возникает парадоксальная ситуация, когда во всех частях МПД и ПР содержание ГАГ становится сравнимым по количеству и качественному составу. Такие изменения соотношения КС и ХС наблюдаются в хрящах с уменьшенным содержанием кислорода и нарушением поступления питательных веществ: ПГ из глубоких слоев хряща обогащены КС по сравнению с ПГ поверхности [5, 12, 18]. Кроме того, изменение биомеханических нагрузок на ткани, подвергающиеся воздействию сил растяжения и сжатия, изменяет тип синтезируемых клетками ГАГ. Снижение гидродинамических свойств ПЯ с возрастом и у больных ИС приводит к повышению компрессионной нагрузки на ФК, которая сама по себе меняет количество и качество продуцируемого клетками матрикса [12]. Биомеханические силы также неблагоприятно изменяют потоки питательных веществ в МПД, которые обычно определяются динамическими силами, действующими как насос, и пассивной диффузией. Эти потоки идут от капиллярной системы тел позвонков и периферии ФК. Изменение структуры ПР и клиновидность дисков меняют условия кровоснабжения дисков и статус питания клеток, что в конечном итоге меняет метаболизм ПГ. Эти изменения похожи на те, что происходят в дисках с возрастом. Отсюда авторы делают вывод, что изменение питания клеток дисков,

вследствие развития сколиотической деформации, изменяет структуру ПГ.

Есть основание считать, что развитие сколиотической болезни является следствием многих причин, одна из которых – нарушение структуры тканей МПД и ПР. Это мнение основывается на исследовании химической структуры ГАГ и степени их сульфатирования. Небольшое количество С-ГАГ в МПД и ПР у больных ИС, по нашим данным, обусловлено не только абсолютным снижением их количества, но и снижением степени сульфатирования ГАГ, то есть уменьшением количества сульфатных групп, содержащихся на условной единице цепи ГАГ (отношение количества С-ГАГ к сумме ХС и КС, выраженное в процентах). Надо отметить, что наиболее значительное снижение степени сульфатирования ГАГ обнаружено в ПР, наименьшее – в ПЯ (табл.).

Дисахаридные единицы ГАГ для ХС состоят из повторов – уроновая кислота плюс галактозамин, а для КС – галактоза плюс глюкозамин. Цепи ГАГ подвергаются модификации с участием специфических ферментов в период формирования ПГ – присоединения цепей ГАГ к коровому белку. Эти модификации определяют количество ацетильных и сульфатных групп в цепях ГАГ. От химической структуры полисахаридов во многом зависят возможности функционирования ПГ в тканях и клетках, поэтому мы определяли количество модифицированных и немодифицированных гексозаминов – ацетилированных

и неацетилированных (табл.). Было обнаружено, что в контрольных образцах ГАГ весь галактозамин (составная часть ХС) присутствует в ацетилированной форме, а в пуле глюкозамина (составная часть КС) содержится небольшое количество неацетилированной формы, которая не превышает 10 % общего количества. У больных ИС в ГАГ во всех указанных тканях резко увеличивается количество немодифицированных форм гексозаминов: около 40 % всего количества глюкозамина находится в неацетилированной форме во всех тканях. Также появляется значительное количество неацетилированного галактозамина. Таким образом, в структурах ХС и КС имеются большие участки немодифицированных структурных единиц. Изменение соотношения галактозамина и глюкозамина также подтверждает повышение относительно содержания КС и снижение ХС.

Эти химические нарушения одновременно с нарушением сульфатирования позволили с помощью метода электрофореза и ферментной обработки ГАГ выделить несulfатированный кератан [1], который можно было определить в виде четкой полосы, не разрушающейся специфическими ферментами – кератаназой и хондроитиназой АС, АВС. В этом веществе аналитически определили присутствие галактозы и глюкозамина, преимущественно неацетилированного, а также отсутствие сульфатных групп, то есть существование кератана было подтверждено аналити-

Таблица

Химическая характеристика гликозаминогликанов межпозвонковых дисков и пластинки роста больных идиопатическим сколиозом (ИС)

Характеристика	Пульпозное ядро		Фиброзное кольцо		Пластинка роста	
	норма	ИС	норма	ИС	норма	ИС
Сульфатирование гликозаминогликанов, %	44,50 ± 6,75	26,30 ± 1,83*	37,80 ± 4,33	20,10 ± 1,84*	26,70 ± 3,26	12,60 ± 1,18*
Отношение галактозамина к глюкозамину	1,45 ± 0,15	0,33 ± 0,02*	1,30 ± 0,26	0,38 ± 0,02*	1,31 ± 0,04	0,36 ± 0,05*
Неацетилированный глюкозамин, %	9,30 ± 0,89	37,70 ± 1,12*	7,10 ± 0,89	44,60 ± 3,91*	8,50 ± 0,69	38,80 ± 3,91*
Неацетилированный галактозамин, %	не обнаружен	22,80 ± 2,24	не обнаружен	30,10 ± 2,43	не обнаружен	29,80 ± 2,47

* P < 0,05.

ческими методами и электрофорезом. Он был обнаружен во всех тканях МПД у больных ИС. Ранее в литературе не описывали такую особенность КС из тканей МПД. Наши исследования МПД показали, что присутствие кератана не является специфическим признаком для ГАГ больных ИС, следы его можно обнаружить в аналогичных тканях людей всех возрастов, начиная с пяти лет, особенно много его у пожилых людей. Но, по нашим данным, есть существенное различие структуры ГАГ МПД у людей 46–50 лет и у больных ИС. У 46–50-летних людей степень сульфатирования ГАГ (понятие введено автором статьи) высокая по сравнению с патологией: 25,5–29,2 % против 12,0–16,0 %. Не удалось с помощью

электрофореза обнаружить немодифицированный хондроитин, возможно из-за его неустойчивости к действию хондроитиназ, но по результатам аналитических исследований его существование исключить нельзя. Надо подчеркнуть, что количество немодифицированного галактозамина относительно меньше, чем глюкозамина, то есть модификация цепей КС нарушена больше, чем ХС. Такие особенности ГАГ в хрящевых тканях МПД больных ИС не могут быть следствием только биомеханических влияний и снижения интенсивности метаболических потоков в тканях, а также возрастных изменений. Вероятно, они определяются генетикой и конституцией человека.

Заключение

В тканях МПД и в ПР больных ИС мы обнаружили существенные изменения качественного и количественного состава ГАГ и химической структуры этих веществ, вероятно, вследствие нарушения функционирования специфических ферментов модификации – ацетилаз и сульфатаз. В тканях МПД и ПР основную часть суммарных ГАГ составляют КС (биосинтез ГАГ сдвинут в сторону увеличения количества КС и уменьшения ХС); углеводные цепи ГАГ мало модифицированы (снижена активность сульфотрансфераз и ацетилаз). Описанные изменения ГАГ в МПД и ПР больных ИС являются следствием нарушения синтеза и (или) модификации цепей ГАГ.

Литература

1. Русова Т.В., Рыкова В.И., Корель А.В. и др. Гликозаминогликаны пластинки роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом // БЭМ. 2005. Т. 139. № 6. С. 738–740.
2. Adams P., Muir H. Qualitative changes with age of proteoglycans of human lumbar discs // Ann. Rheum. Dis. 1976. Vol. 34. P. 289–296.
3. Antoniou J., Arlet V., Goswami T., et al. Elevated synthetic activity in the convex side of scoliotic intervertebral discs and endplates compared with normal tissues // Spine. 2001. Vol. 26. P. E198–206.
4. Antoniou J., Gjudsuzian N.M., Heathfield T.F., et al. The human lumbar endplate. Evidence of changes in biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, aging, and degeneration // Spine. 1996. Vol. 21. P. 1153–1161.
5. Bayliss M.T., Venn M., Maroudas A., et al. Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage // Biochem. J. 1983. Vol. 209. P. 387–400.
6. Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction // Anal. Biochem. 1962. Vol. 4. P. 330–334.
7. Brownlee S.T., Wheat R.W. On the determination of galactosamine-uronic acid // Anal. Biochem. 1966. Vol. 14. P. 414–420.
8. Farnsdale R.W., Buttle D.J., Barrett A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 883. P. 173–177.
9. Ghosh P., Bushell G.R., Taylor T.K., et al. Distribution of glycosaminoglycans across the normal and the scoliotic disc // Spine. 1980. Vol. 5. P. 310–317.
10. Harrington P.R. The etiology of idiopathic scoliosis // Clin. Orthop. Relat. Res. 1977. N 126. P. 17–25.
11. Iozzo R.V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function // Annu. Rev. Biochem. 1998. Vol. 67. P. 609–652.
12. Melrose J., Gurr K.R., Cole T.C., et al. The influence of scoliosis and ageing on proteoglycan heterogeneity in the human intervertebral disc // J. Orthop. Res. 1991. Vol. 9. P. 68–77.
13. Oegema T.R., Bradford D.S., Cooper K.M., et al. Comparison of the biochemistry of proteoglycans isolated from normal, idiopathic scoliotic and cerebral palsy spines // Spine. 1983. Vol. 8. P. 378–384.
14. Ponseti I.V., Pedrini V., Wynne-Davies R., et al. Pathogenesis of scoliosis // Clin. Orthop. Relat. Res. 1976. N 120. P. 268–280.
15. Reissig J.L., Storminger J.L., Leloir L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminoglycans // J. Biol. Chem. 1955. Vol. 217. P. 959–966.
16. Roberts S., Menage J., Eisenstein S.M. The cartilage end-plate and intervertebral disc in scoliosis: calcification and other sequelae // J. Orthop. Res. 1993. Vol. 11. P. 747–757.
17. Roe J.H. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent // J. Biol. Chem. 1955. Vol. 212. P. 335–343.
18. Scott J.E., Haigh M. Keratan sulphate and ultrastructure of cornea and cartilage: a «stand-in» for chondroitin sulphate in conditions of oxygen lack? // J. Anat. 1988. Vol. 158. P. 95–108.
19. Sonrabend D.H., Taylor T.K., Chapman G.K. Intervertebral disc calcification syndromes in children // J. Bone Joint Surg. Br. 1982. Vol. 64. P. 25–31.

Адрес для переписки:

Русова Татьяна Васильевна
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
НИИТО,
TRusova@niito.ru