

## Метаболические изменения в соединительной ткани при дегенеративно-дистрофическом повреждении сухожилий у экспериментальных животных

А.М.Магомедов, А.А.Коструб, Р.И.Блонский

ГУ «Институт травматологии и ортопедии АМН Украины»  
Киев, Украина

Представлена динамика метаболических изменений в структуре коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ) в зависимости от кратности введения 0,025 мл дипроспана в толщу сухожилия экспериментальных животных.

**Ключевые слова:** модель, сухожилие, дипроспан, дегенеративно-дистрофический процесс, коллагеназа.

### ВВЕДЕНИЕ

Синдром хронической перегрузки сухожилий (СХПС) является одной из часто встречаемых патологий у спортсменов и лиц, которые занимаются физическим трудом. Его главной причиной является несоответствие между индивидуальной способностью сухожилия к перенесению нагрузки, которая прикладывается в процессе той или другой спортивной или производственной деятельности, и фактической нагрузкой, выполняемой человеком [2].

Несвоевременная диагностика, продолжение нагрузки и неэффективность методов лечения больных с СХПС (особенно спортсменов) вызывают срыв компенсаторных механизмов. Это сопровождается возникновением стойкого болевого синдрома со следующей угрозой патологического разрыва [3].

Однако ни один из традиционных методов лечения не только не гарантирует позитивного результата на стадии дегенерации, но и может усилить дегенеративно-дистрофические изменения в самом сухожилии и в местах его перехода в костную ткань [6].

В связи с этим необходимо иметь четкое представление о биохимических изменениях,

которые возникают в сухожилии на стадии дегенеративно-дистрофического процесса и, исходя из полученных результатов, предложить новые эффективные пути лечения этой патологии.

Большую информативную ценность с точки зрения механизма формирования дегенеративно-дистрофических процессов может дать изучение метаболизма основного белка соединительной ткани — коллагена и межклеточного вещества — протеогликанов (агриканов), роль которых в ремодулировании соединительной ткани при дегенеративно-дистрофических нарушениях сухожилий существенна.

Целью данного исследования было определить в эксперименте динамику метаболических изменений в структуре коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ) в зависимости от кратности введения 0,025 мл дипроспана в толщу сухожилия экспериментальных животных.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Изучить метаболические изменения коллагена.
2. Изучить метаболические изменения ГАГ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных задач использовали следующие биохимические методы: методика определения активности коллагеназы, методика определения фракций гидроксипролина (ГП), методика определения ГАГ.

Опыты проведены на 60 крысах-самцах весом  $300 \pm 10$  г, которым в толщу ахиллового сухожилия на 0,5 см от места прикрепления пяточной кости вводили с помощью инсулиновой иголки 0,025 мл дипроспана.

Активность коллагеназы определяли по методу S.Lindy, J.Halme. Принцип метода основан на определении количества гидроксипролина,

отщепленного от субстрата под действием коллагеназы сыворотки крови. Инкубацию проводили при 37 °С в присутствии ионов кальция и рН=7,54. Активность коллагеназы выражали в мкмоль оксипролина/л\*час. В качестве субстрата использовали коллаген производства фирмы «SIGMA» (США) [5].

Фракции гидроксипролина выделяли по методу S.Frey и определяли по методу H.J.Stegemann. Принцип метода основан на определении оптической плотности красного хромогена в результате окисления и декарбоксилирования свободной аминокислоты и конденсации продуктов окисления паради-метиламинобензальдегидом. Гидроксипролин окисляли хлорамином В. Концентрацию выражали в мкмоль/л [4, 7].

Гликозаминогликаны определяли в сыворотке крови орциновым методом (С.А.Кляцкин, Р.И.Лифшиц). Принцип метода заключается в следующем: ГАГ выделяют из сыворотки крови цитилпиридиния хлоридом. Освобожденные в результате гидролиза гексозы взаимодействуют с орциновым реактивом, окрашивая раствор в розовый цвет. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию гексоз [1]. Концентрацию ГАГ выражали в г/л.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных при исследовании активности коллагеназы выявил, что активность этого фермента на 7-е сутки после начала эксперимента достигает 3,27±0,10 мкмоль/л\*ч, а у контрольной группы — 2,80±0,15 мкмоль/л\*ч. Возрастание активности коллагеназы в опытной группе относительно контрольной составило 117% (рис. 1).

Концентрация свободной фракции ГП (биохимический маркер распада коллагена) в эти же сроки наблюдения составила 114% относительно контрольной группы. В абсолютных

показателях — 9,80±0,30 мкмоль/л при норме 8,59±0,43 мкмоль/л.

Белковосвязанный ГП (показатель, отражающий синтетическую фазу в метаболизме коллагена) на 7-е сутки после начала опыта остается на уровне ГП группы контрольных животных, достигая 4,10±0,12 мкмоль/л.

Содержание ГАГ, которые отражают интенсивность метаболических процессов межклеточного вещества, на 7-е сутки после начала опыта имеет тенденцию к возрастанию и достигает 105% по отношению к показателям контрольных животных (табл. 1).

На 14-е сутки наблюдения активность коллагеназы возрастает до 143% по сравнению с показателями контрольных животных. Концентрация свободной фракции ГП продолжает возрастать и достигает в абсолютных показателях 9,70±0,20 мкмоль/л. У контрольной группы этот показатель составляет 8,59±0,43 мкмоль/л. В процентном отношении это возрастание составило 113% (табл. 1). В эти же сроки наблюдения содержание белковосвязанного ГП снижается до 3,80±0,10 мкмоль/л, тогда как у контрольных животных этот показатель составляет 4,14±0,16 мкмоль/л. Концентрация межклеточного вещества ГАГ продолжает возрастать по сравнению с предыдущим сроком наблюдения и достигает 123% по отношению к норме. В абсолютных показателях — 0,070±0,002 г/л.

На 21-е сутки исследования активность коллагеназы в сыворотке крови продолжает возрастать и достигает 4,90±0,10 мкмоль/л\*ч, тогда как в контрольной группе — 2,80±0,15 мкмоль/л\*ч. Это составило 175% относительно нормы (табл. 1). Наряду с возрастанием активности коллагеназы увеличивается и содержание свободной фракции гидроксипролина, что свидетельствует о высокой катаболической активности в метаболизме основного белка соединительной ткани и характеризует разрушение

ТАБЛИЦА 1

**Биохимические показатели сыворотки крови экспериментальных животных с моделью дегенеративно-дистрофических нарушений сухожилий**

	Коллагеназа, мкмоль/л*ч	Свободная фракция ГП, мкмоль/л	Белковосвязанная фракция ГП, мкмоль/л	ГАГ, г/л
Контрольная группа	2,80±0,15	8,59±0,43	9,14±0,16	0,057±0,003
7 сут.	3,27±0,10	9,80±0,30	4,10±0,12	0,060±0,001
14 сут.	4,00±0,20	9,70±0,20	3,80±0,10	0,070±0,002
21 сут.	4,90±0,10	12,70±0,30	3,00±0,07	0,087±0,002
28 сут.	4,80±0,20	11,90±0,10	2,80±0,06	0,079±0,001
35 сут.	4,90±0,20	12,80±0,40	3,10±0,20	0,084±0,002

коллагена. Так, содержание этой аминокислоты составило 148% по отношению к показателям в контрольной группе животных. В эти же сроки наблюдения концентрация белковосвязанного гидроксипролина (биохимического маркера синтетической фазы в метаболизме коллагена) снижается до 72% по отношению к показателям контрольной группы животных. В абсолютных показателях это снижение составило  $3,00 \pm 0,07$  мкмоль/л, тогда как у контрольной группы этот показатель равен  $4,14 \pm 0,16$  мкмоль/л. Изменения в показателях межклеточного вещества ГАГ еще больше выражены. Так, в опытной группе содержание ГАГ равно  $0,087 \pm 0,002$  г/л, а в контрольной —  $0,057 \pm 0,003$  г/л, в процентном отношении — 153%.

На 28-е сутки наблюдения выявили, что активность коллагеназы остается на уровне 21-х суток с небольшими изменениями. Это составило 171% по отношению к показателям контрольной группы (табл. 1). Следует отметить, что содержание свободной фракции гидроксипролина также остается на уровне 21-х суток с небольшим возрастанием — 139% по отношению к показателям контрольной группы. В то же время содержание белковосвязанного гидроксипролина еще больше снижается. Оно составило 68% от нормы (табл. 1). Концентрация ГАГ несколько снижается по сравнению с их содержанием на 21-е сутки наблюдения.

На 35-е сутки наблюдения активность коллагеназы остается без изменений относительно показателей 21-х суток, что составило 179% относительно нормальных значений. Содержание фракций гидроксипролина (свободной и белковосвязанной) также остается на уровне показателей 21-х суток наблюдения. Концентрация ГАГ на 35-е сутки исследования остается без особых изменений относительно показателей ГАГ контрольной группы животных.

Таким образом, максимальные изменения в метаболизме органических компонентов соединительной ткани при дегенеративно-дистрофических повреждениях сухожилий экспериментальных животных у опытной группы достигаются на 21-е сутки после начала опыта. Изменения с небольшими отклонениями сохраняются и на 28-е и 35-е сутки наблюдения.

## ВЫВОДЫ

У экспериментальных животных с моделью дегенеративно-дистрофических повреждений сухожилий выявлена связь между развитием патологического процесса и метаболическими нарушениями основных компонентов соединительной

ткани. Это подтверждают показатели, полученные при динамическом исследовании сыворотки крови у опытных и контрольных животных. Если в первые сутки после начала опыта активность коллагеназы (фермент, который участвует в катаболизме основного белка соединительной ткани — коллагена) не имеет особых отличий как у опытных, так и у контрольных животных, то на 14-е сутки наблюдения у группы опытных животных она возрастает до 143% относительно контрольной группы. Наряду с возрастанием активности фермента возрастает и концентрация свободной фракции гидроксипролина, а белковосвязанной фракции гидроксипролина снижается.

Активность коллагеназы достигает своего максимума на 21-е сутки с момента начала эксперимента, после чего уровень последнего стабилизируется с несущественными изменениями (28-е и 35-е сутки). Аналогичные изменения обнаруживаются и в содержании метаболитов коллагена. Так, наиболее высокая концентрация свободной фракции гидроксипролина наблюдается на 21-е сутки, после чего отмечается относительная стабилизация ее уровня с небольшими колебаниями в последующие сроки наблюдения (28-е и 35-е сутки). Это свидетельствует о преобладании распада над синтезом в метаболизме коллагена. Наиболее сильная разобщенность в фазах этого процесса достигается на 21-е сутки после начала опыта.

В результате анализа полученных данных можно предположить, что многократное введение раствора дипроспана в толщу сухожилий (три и более раз) приводит к прямому разрушению коллагена. Его распад сопровождается выходом лизосомальных ферментов и, вследствие этого, развитием вялотекущего воспалительного процесса в толще сухожилия. Вышеперечисленные процессы сопровождаются гибелью специализированных структур ткани сухожилия (теноцитов и коллагеновых волокон) с последующим замещением их аморфным межклеточным веществом. Вышеупомянутые изменения характерны для дегенеративно-дистрофического процесса. Степень метаболических нарушений определяет глубину развития патологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кляцкин С.А., Лифшиц Р.И. Методика определения гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных // Лаб. дело. — 1989. — №10. — С. 51-53.
2. Спортивные травмы. Клиническая практика предупреждения и лечения / Под общ. ред.

- П.А.Ф.Х.Ренстрема. — К.: Олимпийская лит-ра, 2003. — 471 с.
3. Спортивные травмы. Основные принципы профилактики и лечения / Под общ. ред. П.А.Ф.Х.Ренстрема. — К.: Олимпийская лит-ра, 2002. — 378 с.
  4. Frey S. Etude d'une methode d'exploration et du taux normal de l'hydroxyproline du serum // Biochem. Biophys. — 1965. — Vol. 3. — №2. — P. 446-450.
  5. Lindy S., Halme J. Collagenolytic activity in rheumatoid synovial tissue // Clin. Chim. Acta. — 1973. — Vol. 47. — №2. — P. 153-157.
  6. Maffulli N. Tendon injuries. Basic science and clinical medicine / N.Maffulli, P.Renström, W.B.Leadbetter. — London Limited: Springer Verlag, 2005. — 332 p.
  7. Stegemann H.J. A simple procedure for the determination of hydroxyproline in urine and bone // Biochem. Med. — 1952. — Vol. 3. — №1. — P. 23-30.

**А.М.Магомедов, А.А.Коструб, Р.И.Блонський.** *Метаболічні зміни в сполучній тканині при дегенеративно-дистрофічному ушкодженні сухожиль експериментальних тварин.* Київ, Україна.

**Ключові слова:** модель, сухожилля, дипроспан, дегенеративно-дистрофічний процес, колагеназа.

*Представлено динаміку метаболічних змін у структурі колагена й глікозаміногліканів залежно від кратності введення 0,025 мл дипроспана в товщу сухожилля експериментальних тварин.*

**A.M.Magomedov, A.A.Kostrub, R.I.Blosky.** *The metabolism's change in the conjunctive tissue during the degenerative-dystrophic process in the tendons by the experimental animals.* Kyiv, Ukraine.

**Key words:** model, tendons, diprospan, degenerative-dystrophic process, collagenase.

*Produce the dynamics of the metabolism's change in the structure by the collagen and glucosaminglicans depend of multiple injection of the 0,025 ml diprospan in the tendon by the experimental animals.*

Надійшла до редакції 30.08.2009 р.