

METODICA DI DOSAGGIO DEI GLICOSAMINOGLICANI SOLFATI NEL LIQUIDO SINOVALE DI CAVALLO: PROSPETTIVE PER LO STUDIO DELLA PATOLO- GIA DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

BORGHETTI P. (*), MARTINI F.M. (**), DE ANGELIS E. (*)

(* *Ist. Anatomia Patologica Veterinaria, Parma*

(** *Ist. Clinica Chirurgica Veterinaria, Parma*

RIASSUNTO

Gli Autori hanno analizzato la sensibilità e la riproducibilità del dosaggio colorimetrico dei glicosaminoglicani solfati totali (GAGs) e del cheratansolfato (KS) nel liquido sinoviale ottenuto dalle articolazioni metacarpo-falangee di 45 cavalli. E' risultato che nè la refrigerazione per 24 ore nè il congelamento del liquido sinoviale influiscono sul dosaggio rispetto al campione a fresco. Inoltre sono state determinate le diluizioni e i trattamenti enzimatici del campione opportuni per l'attendibilità della metodica. I valori ottenuti sono stati poi analizzati in base alla presenza e al tipo delle lesioni della cartilagine articolare riscontrate all'esame anatomopatologico. I campioni di liquido sinoviale ottenuti da articolazioni con lesioni degenerative macroscopiche della cartilagine, hanno presentato livelli di GAGs totali ($255,6 + 125 \mu\text{g/ml}$) e di KS ($95,3$ i $74,1 \mu\text{g/ml}$) significativamente più elevati ($P < 0,01$) di quelli del liquido sinoviale di articolazioni non patologiche (GAGs: $76,8 \pm 24,2 \mu\text{g/ml}$; KS: $33 \pm 13,3 \mu\text{g/ml}$).

SUMMARY: The Authors analyzed the sensitivity of colorimetric assay of total glycosaminoglycans sulphate and keratan sulphate in synovial fluid obtained from metacarpophalangeal joints of 45 horses. Both cooling for 24 hours and freezing of synovial fluid sample didn't influence the results of the measurement. Suitable dilutions and enzymatic treatments of the sample were also determined to assess the accuracy of the assay. The data were then analyzed in relation to the presence and type of macroscopic lesions of the

articular cartilage. Synovial fluids from joints with lesions showed levels of GAGs ($255,6 \pm 125 \mu\text{g/ml}$) and of KS ($95,3 \pm 74,1 \mu\text{g/ml}$) significantly higher ($P < 0,01$) than normal joints (GAGs: $76,8 \pm 24,2 \mu\text{g/ml}$; KS: $33 \pm 13,3 \mu\text{g/ml}$).

INTRODUZIONE

Data l'importanza della patologia articolare nel cavallo sportivo, attualmente si stanno studiando nuovi metodi di indagine che permettano di valutare la gravità e l'evoluzione del processo degenerativo del tessuto cartilagineo articolare. Tali metodi si basano sul fatto che la cartilagine, in corso di osteoartrite, a causa dell'alterato metabolismo tissutale, rilascia nel liquido sinoviale diverse molecole o frammenti molecolari che, essendo espressione diretta del danno, possono fungere da indicatori del processo degenerativo e degradativo della cartilagine. In quest'ottica, i glicosaminoglicani solfati rappresentano le molecole di derivazione cartilaginea attualmente più studiate soprattutto in medicina umana (3,5,6,7). In questo lavoro, considerata la limitata esperienza in campo equino (1), si è voluto analizzare la applicabilità e l'attendibilità del dosaggio colorimetrico dei glicosaminoglicani solfati totali (GAGs) e del cheratansolfato (KS) nel liquido sinoviale di cavallo e valutare tali valori in base al tipo ed alla gravità delle lesioni cartilaginee riscontrate all'esame anatomopatologico.

MATERIALI E METODI

Esame del liquido sinoviale Il liquido sinoviale è stato prelevato da entrambe le articolazioni metacarpo-falangee di 45 cavalli di varie razze prevalentemente da lavoro e di età compresa tra 1 e 25 anni. Appena dopo il prelievo, i campioni di liquido sinoviale (L.S.) sono stati valutati macroscopicamente in base al volume totale, colore, viscosità e presenza di sangue. I campioni sono stati poi centrifugati a 2000 rpm per 10 minuti e successivamente il sovranatante è stato sottoposto ad una seconda centrifugazione a 10.000 rpm per 5 minuti. Il campione ottenuto è stato diluito e trattato con $300 \mu\text{g/ml}$ di papaina per 2 ore a 65°C . Per il dosaggio del cheratansolfato il campione è stato sottoposto ad un secondo trattamento enzimatico con condroitinase ABC. Dopo i trattamenti enzimatici sopra descritti ai campioni è stato aggiunto DMMB (dimetilmetilene blu) e i valori di

GAGs e di KS sono stati misurati con spettrofotometro a 525 nm (4). I valori di densità ottica (D.O.) sono riportati a $\mu\text{g/ml}$ in base alle rette degli standards (condroitinsolfato A da 0,5 a 6 μg e cheratansolfato da 0,5 a 9 μg).

Alcune tappe metodologiche sono state opportunamente valutate ai fini dell'ottimizzazione della metodica descritta: - sono state analizzate differenti diluizioni del campione allo scopo di ottenere valori di D.O. che rientrino nelle rette di D.O. ottenute con valori crescenti degli standards utilizzati (condroitinsolfato A e cheratansolfato). - per il dosaggio del cheratansolfato si è valutato l'effetto di differenti concentrazioni di condroitinase ABC (da 0,1-0,5 U/ml) e tempi di incubazione a 37°C (da 4 ore a 12 ore) al fine di eliminare completamente l'interferenza dovuta ai condroitinsolfati. - sono stati determinati i valori dei GAGs sui sovrantanti dei campioni sia a fresco che dopo stoccaggio a - 80°C - si è inoltre valutato un eventuale effetto della refrigerazione del campione di liquido sinoviale in toto per 24 ore a 4° C prima della centrifugazione.

Esame macroscopico delle articolazioni Dopo la regolare macellazione, si è proceduto all'esame anatomopatologico delle articolazioni metacarpo-falangee da cui era stato prelevato il liquido sinoviale (in totale 90 articolazioni osservate) classificandole in base alla assenza [N = normale (n° 31 articolazioni)] o presenza [P = patologico (n° 59 articolazioni)] di lesioni:

- lesione puntiforme crateriforme
- erosione focale
- aree di assottigliamento
- aree di corrugamento e fibrillazione
- erosioni focali multiple
- fessurazioni lineari da sfregamento
- erosioni estese
- reazioni fibrocartilaginee
- osteofitosi marginali
- coinvolgimento capsulo-sinoviale

RISULTATI

Dalle indagini effettuate, è risultato che l'eventuale presenza di strie di sangue nel campione, dovuta alle modalità di prelievo, è eliminata costantemente con la prima centrifugazione, mentre la presenza di emartro può esse-

re totalmente o parzialmente (in presenza di emolisi diffusa) eliminata con la seconda centrifugazione: in quest'ultimo caso l'attendibilità del dosaggio può essere relativa. Le diluizioni del campione più idonee per il dosaggio sono risultate 1/12,5-1/25 per i GAGs e 1/4-1/8 per il cheratansolfato. Per il dosaggio dei GAGs totali, tali diluizioni risultano importanti in quanto permettono di ottenere valori di D.O. che rientrano nella retta degli standards ottenuta con 1-6 μg di condroitinsolfato in quanto con valori maggiori di 6 mg viene persa la linearità della risposta; tale problema è di minor entità per il KS la cui retta degli standards risulta lineare tra 1 e 9 μg (Graf. 1). L'eliminazione completa dell'interferenza colorimetrica dei condroitinsolfati per la determinazione del KS è stata ottenuta con il trattamento del campione diluito con condroitinase 0,1 U/ml per 12 ore.

Lo stoccaggio a -80°C non altera i valori di GAGs rispetto ai campioni trattati a fresco. Analogamente la refrigerazione del campione per 24 ore prima delle centrifugazioni non comporta significative differenze di dosaggio.

I campioni di liquido sinoviale ottenuti da articolazioni con lesioni degenerative macroscopiche della cartilagine, hanno presentato alti livelli di GAGs totali, con intervallo da 80 a 625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e una media (+ ds) di 255,6

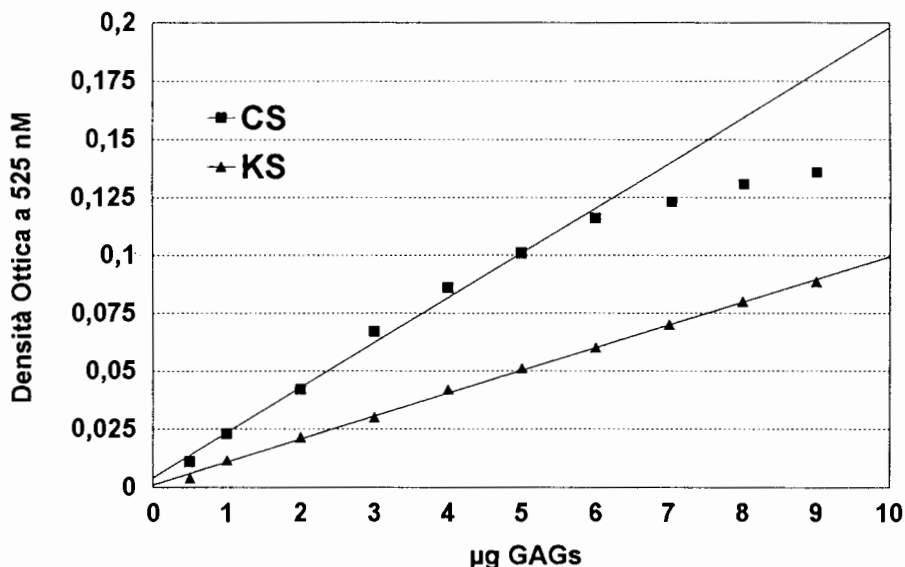


Grafico 1 - Rette degli standards.

(± 125) $\mu\text{g/ml}$ e di KS, da 15 a 223 $\mu\text{g/ml}$ con una media (+ ds) di 95,3 ($\pm 74,1$). Tali valori sono risultati significativamente più elevati ($P < 0,01$) di quelli del liquido sinoviale di articolazioni non patologiche (GAGs: 76,8 + 24,2 $\mu\text{g/ml}$; KS: 33 + 13,3 $\mu\text{g/ml}$).

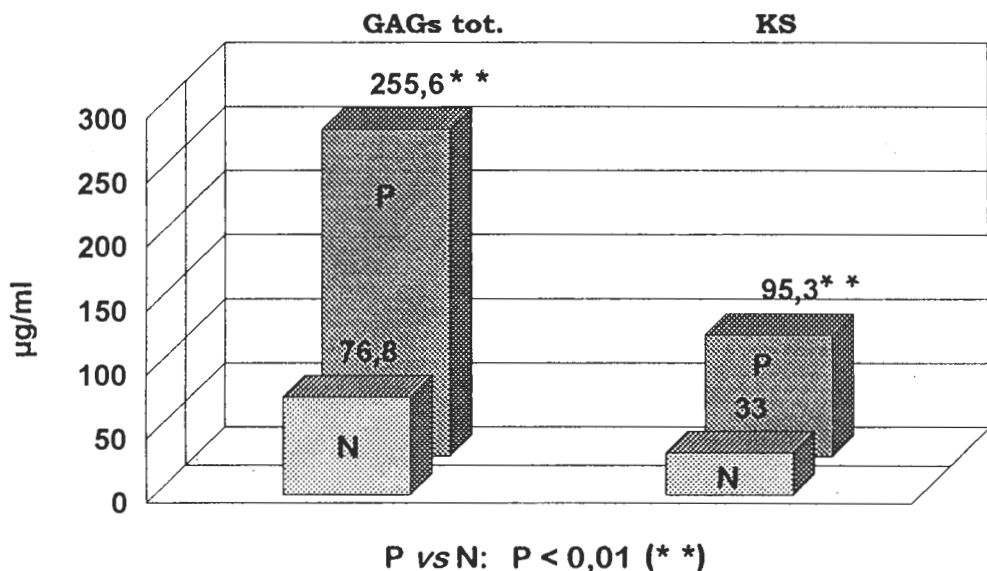


Grafico 2 - Dosaggio colorimetrico (DMMB).

DISCUSSIONE

Con gli opportuni adattamenti, riguardanti soprattutto le centrifugazioni, diluizioni e trattamenti enzimatici, il dosaggio colorimetrico dei GAGs e del cheratansolfato è risultato una metodica di facile e rapida applicazione anche sul liquido sinoviale di cavallo con ripetibilità ed attendibilità dei risultati.

L'ininfluenza della refrigerazione del campione in toto per 24 ore prima del trattamento e del dosaggio concede un sufficiente margine nella gestione del campione prelevato in campo.

Vista la significativa differenza dei valori dei GAGs totali e del KS tra articolazioni patologiche e normali, ne risulta che tale determinazione può essere utilizzata anche nel cavallo per valutare l'entità del rilascio dei proteoglicani da parte del tessuto cartilagineo in corso di fenomeni degene-

rativi. L'ampio range di valori riscontrato nei campioni patologici porta però a considerare che l'utilità di tali metodiche nell'applicazione clinica, debba essere ulteriormente approfondita sulla base non solo della gravità ma soprattutto del momento evolutivo della lesione.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Alwan WH, Carter SD, Bennett D, Edwards GB (1991). *Glycosaminoglycans in horses with osteoarthritis*. Equine Vet J, 23 (1), 44-47.
- 2) Carroll GJ (1987). *Spectrophotometric measurement of proteoglycans in osteoarthritic synovial fluid*. Annals of the Rheumatic Diseases, 46, 375-379.
- 3) Carroll GJ, Mc Cappin S, Bell M, Schwarzer A, Breidahl P (1991). *Comparison of keratan sulphate concentration and the size distribution of proteoglycans in the synovial fluid of patients with osteoarthritis and pyrophosphate arthropaty*. Rheumatol Int, 11, 63-68.
- 4) Farnsdale RW, Buttle DJ, Barret AJ (1986). *Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue*. Biochim Biophys Acta, 883, 173-177.
- 5) Saxne T, Heinegard D, Wollheim FA. (1987) *Cartilage proteoglycans in synovial fluid and serum in patients with inflammatory joint disease*. Arthritis and Rheumatism, 9 (30), 972-979.
- 6) Sweet MBE, Coelho A, Schnikler CM, Schniker TJ, Lenz ME, Jakim I, Kuettner KE, Thonar MA. (1988) *Serum keratan sulfate levels in osteoarthritis patients*. Arthritis and Rheumatism, 5 (31), 648-652.
- 7) Thonar EJM, Lenz ME, Klintworth GK, Caterson B, Pachman LM, Glickman P, Kak R, Huff J, Kuettner KE. (1985) *Quantification of keratan sulfate in blood as a marker cartilage catabolism*. Arthritis and Rheumatism, 12 (28), 1367-1376.