Influenza delle alterazioni artrosico-simili sul rapporto condroitinsolfato: cheratosolfato in cartilagini articolari di cavia

È noto che, nella cartilagine umana, il cheratosolfato è praticamente assente alla nascita ed aumenta con l'età fino a raggiungere, verso i 20-30 anni, una concentrazione massima che rimarrà pressoché costante per tutta la vita; il condroitinsolfato invece diminuisce linearmente con l'età¹. Ciò significa che con l'età diminuisce il rapporto galattosammina/gluco-sammina (GAL/GLU). Si può pertanto avanzare l'ipotesi che anche nell'artrosi, che è una malattia degenerativa, si possa verificare un'analogia diminuzione del rapporto GAL/GLU.

Per provare sperimentalmente tale ipotesi è stato determinato il contenuto relativo di esosammine nelle cartilagini articolari di cavie normali e di cavie nelle quali erano state indotte alterazioni artrosico-simili.

Le esperienze sono state condotte su vari lotti di cavie dello stesso ceppo, della stessa età (5 mesi), dello stesso peso (600-650 grammi), di ambedue i sessi, mantenute nelle stesse condizioni ambientali e di alimentazione. Si procurava manualmente una lussazione dell'anca destra secondo la tecnica descritta precedentemente²; dopo 90 giorni dal trauma venivano prelevate le teste femorali delle anche così trattate; come controllo si prelevavano, in animali sani, le teste femorali di ambedue le anche.

La porzione cartilaginea, ottenuta mediante l'asportazione della componente ossea subcondrale con fresatura a mano, veniva conservata a -5° C in soluzione fisiologica. Le cartilagini venivano poi lavate per decantazione con acqua distillata fredda, asciugate con carta da filtro, pesate e quindi congelate in azoto liquido. Esse venivano successivamente polverizzate in un tubo d'acciaio inossidabile secondo la tecnica di Furchgott e Gubareff³ così modificata: un martello elettromagnetico munito di pistone di acciaio del peso di circa 520 g colpiva per tre volte la massa congelata ad una velocità media di 15 m/sec. Le cartilagini polverizzate venivano subito lavate per tre volte con 10 ml di etanolo al 70% freddo e quindi per tre volte con 10 ml di acqua fredda. Il residuo, separato dal sovrannatante per centrifugazione a 2500 r.p.m. per 2 min, veniva essiccato e successivamente sottoposto a idrolisi mediante riscaldamento a 100° C per 4 ore con HCl 4N (1 ml per 100 mg di residuo). L'idrolizzato si portava a secco sotto vuoto su KOH, si riprendeva con acqua e si riportava a secco; questa operazione veniva ripetuta 5-6 volte fino ad ottenere un pH compreso fra 2 e 3. Il residuo veniva infine disciolto con HCl 0,3 N; le eventuali impurezze solide venivano separate per filtrazione.

Nell'idrolizzato veniva effettuato il dosaggio delle esosammine totali secondo il metodo di Elson e Morgan⁴ così modificato: a 0,5 ml della frazione da dosare si aggiungeva 1 ml di soluzione di acetilacetone (distillato di fresco) al 3% in Na₂CO₃ 1,25 N; dopo un'ora in bagno maria bollente, i campioni venivano raffreddati e addizionati di 4 ml di reattivo di Ehrlich (3 ml di etanolo si aggiungono a 1 ml di una soluzione preparata di fresco sciogliendo 1,6 g di p-dimetilammino-benzaldeide in 30 ml di HCl concentrato e 30 ml di etanolo); si agitava vigorosamente allo scopo di far liberare la massima quantità di CO₂; dopo almeno un'ora di riposo a temperatura ambiente, si leggeva l'intensità di colore a 535 nm con il colorimetro EEL-Spectra; la lettura veniva effettuata contro un bianco costituito solo da HCl 0,3 N e dai reattivi.

La separazione delle due esosammine⁵ si otteneva sottoponendo a cromatografia su Dowex 50 w x 8 (200-400 mesh) forma H⁺ un'aliquota di 2 ml di una soluzione di esosammine totali in HCl 0,3 N ad una concentrazione di 500 µg/ml; il dosaggio delle esosammine veniva eseguito con il metodo di Elson-Morgan modificato, precedentemente descritto.

Furono effettuate 6 esperienze su un totale di 66 cartilagini normali (corrispondenti a 33 cavie in condizioni fisiologiche) e 3 esperienze su un totale di 32 cartilagini patologiche (corrispondenti a 32 cavie in cui erano state indotte alterazioni artrosico-simili). Sulla base della concentrazione totale delle due esosammine veniva calcolato, per ogni esperienza, il rapporto GAL/GLU. I valori sperimentali sono riportati nelle Tab. 1 e 2.

Rapporto GAL/GLU nelle cartilagini articolari normali

TABELLA 1

Esperimento n.	Numero cartilagini	Contenuto di GAL (in mg)	Contenuto di GLU (in mg)	Rapporto GAL/GLU	Media del rapporto GAL/GLU
1	10	325,9	70,4	4,63	4,79
2	6	195,8	38,4	5,10	
3	10	230,9	51,3	4,50	
4	10	228,8	49,2	4,65	
5	14	386,3	75,6	5,11	
6	16	426,7	97,4	4,75	

Rapporto GAL/GLU nelle cartilagini articolari patologiche

TABELLA 2

Esperimento n.	Numero cartilagini	Contenuto di GAL (in mg)	Contenuto di GLU (in mg)	Rapporto GAL/GLU	Media del rapporto GAL/GLU
1	9	291,6	95,3	3,06	3,02
2	15	383,6	126,2	3,04	
3	8	238,4	80,8	2,95	

Dai dati riportati nelle tabelle si vede che il rapporto medio GAL/GLU, nelle cartilagini normali, è 4,79, nelle patologiche è 3,02. L'alterazione del rapporto, in condizioni artrosico-simili, potrebbe essere dovuta ad una diminuzione del livello del condroitinsolfato, in accordo con quanto trovato da Kaplan e Meyer¹ per l'invecchiamento. Risulta quindi che nell'artrosi post-traumatica sperimentalmente indotta nelle cavie, si verifica un'alterazione a carico della sostanza fondamentale.

Ricevuto il 23 ottobre 1971.

FRANCESCO DE ANGELIS RICCIOTTI (*)
 CARLO DELFINI (**), GIANNI LANZI (**)
 MAURIZIO MONTELEONE (*)
 e FRANCESCO POCCHIARI (**)

¹ KAPLAN, D. & K. MEYER. *Nature*, **183**, 1267 (1959).

² MONTELEONE, M. & P. P. MILELLA. *Atti S.O.T.I.M.I.*, **23**, 1 (1968).

³ FURCHGOTT, R. F. & T. GUBAREFF. *J. Biol. Chem.*, **223**, 377 (1956).

⁴ ELSON, L. A. & W.T.J. MORGAN. *Biochem. J.*, **27**, 1824 (1933).

⁵ GARDELL, S. *Acta Chem. Scand.*, **7**, 207 (1953).

(*) *Clinica Ortopedica e Traumatologica, Università di Roma.*

(**) *Laboratori di Chimica Biologica, Istituto Superiore di Sanità, Roma.*