

Биохимия протеогликанов синовиальной жидкости в динамике развития остеоартроза

Т.В. Русова, В.С. Байтов

Biochemistry of synovia proteoglycans in the dynamics of osteoarthritis development

T.V. Rusova, V.S. Baitov

Федеральное государственное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи»
(директор – д.м.н., профессор М.А.Садовой)

В синовиальной жидкости больных остеоартрозом разной стадии аналитически определяли содержание гликозаминогликанов (ГАГ) и комплексы протеогликанов (ПГ) методом электрофореза в геле агарозы. На ранних стадиях заболевания количество ГАГ в синовиальной жидкости возрастает, а на поздних – снижается, что отражает динамику изменений в суставном хряще. Количество ГАГ, их качественный состав и структурная агрегированность ПГ может служить диагностическим тестом риска возникновения и динамики развития остеоартроза.

Ключевые слова: остеоартроз, синовиальная жидкость, протеогликаны.

The content of glycosaminoglycans (GAG) and the complexes of proteoglycans (PG) were determined analytically in synovia of patients with osteoarthritis of different stages by the method of electrophoresis in agarose gel. The amount of GAG in synovia increases at early stages of the disease, and at the late ones it decreases, thereby reflecting the dynamics of changes in articular cartilage. The amount of GAG, their qualitative composition and PG structural aggregability can serve as a diagnostic test for risk of osteoarthritis occurrence and its development dynamics.

Keywords: osteoarthritis, synovia, proteoglycans.

Остеоартроз (ОА) – болезнь суставов, которая характеризуется разрушением и изменением метаболических процессов во внутрисуставных тканях, и в первую очередь – в хряще. Наиболее признанный метод оценки повреждения суставов косвенный – измерение ширины внутреннего пространства сустава на рентгеновских снимках. Для надежного диагноза прогрессирования заболевания требуется до 2 лет непрерывного наблюдения, поскольку изменения ширины внутрисуставной щели достаточно малы по сравнению с ошибкой измерения. Ясно, что для выявления пациентов с высоким риском возникновения деструктивного ОА и контролируемого эффекта лекарственного лечения нужны более чувствительные методы исследования, чем рентгеноскопия. Альтернативные биохимические методы включают определение специфических и чувствительных биохимических маркеров, отражающих отклонения метаболизма хрящевой ткани. Они могут быть также полезны для исследования и контроля течения ОА.

Структура основного количества протеогликанов (ПГ) синовиальной жидкости (СЖ) пол-

ностью аналогичны ПГ хряща и поступают из хрящевой ткани без изменения белкового кода [1, 2]. Часть ПГ, имеющие более малые молекулярные размеры, вероятно, являются продуктами влияния протеолиза. Эти ПГ свободно диффундируют из хряща в СЖ [1, 2]. При ОА ткани суставов, особенно суставной хрящ, подвергаются значительным дегенеративным изменениям, выраженным в различной степени. Метаболизм компонентов внеклеточного матрикса (коллаген, ПГ и неколлагеновые белки матрикса) сильно модифицируются в процессе болезни, и продукты извращенного метаболизма поступают в СЖ [3, 4, 5]. Этот физиологический механизм допускает поиск биохимических маркеров, отражающих течение патологического процесса с целью использования их в диагностических целях. Мы исследовали изменения качественного и количественного состава ПГ/ГАГ синовиальной жидкости больных идиопатическим ОА в динамике развития болезни с целью установить возможности использования методов аналитической биохимии в диагностике ранних и последующих стадий заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мы провели биохимические исследования СЖ 65 пациентов (30-47 лет), проходивших лечение по поводу идиопатического остеоартроза (ОА) 1-III степени. Контрольную группу составил посмертный материал хряща коленного сустава от 5 внезапно погибших людей в возрасте 25-47 лет без дегенеративных изменений хряща.

ПГ/ГАГ синовиальной жидкости после обработки раствором папаина (0,2 мг папаина на миллилитр жидкости с добавлением 0,01М ЭДТА и 0,005 М цистеина в буфере 0,2 М ацетата натрия pH 5,8, 60 °С, 18 час). Экстракты обрабатывали хлороформом, диализовали против буфера 50 мМ ацетата натрия с 0,01М ЭДТА pH 5,8 (+4 °С, 24 часа). Белки осаждали хлорной кислотой (0,5 н) и удаляли центрифугированием (9000 g, 2 °С, r_{∞} = 8 см). После повторного диализа ПГ осаждали тремя объемами этанола в присутствии 4 % ацетата калия (-18 °С, 12 час), осадок отделяли центри-

фугированием, промывали этанолом, ацетоном и растворяли в воде. Для выделения сульфатированных ПГ/ГАГ в раствор добавляли 10 % цетилпиридиний хлорид (ЦПХ) до насыщения. Аналитически определяли содержание моносахаров, характеризующих отдельные виды ГАГ (хондроитинсульфат (ХС), кератансульфат (КС)), сульфатированные ГАГ ($C_{ГАГ}$) в этом осадке и в не осаждаемом пуле. Аналитические методы исследования ГАГ/ПГ (уроновые кислоты, гексозы, гексоамины, сульфатированные ГАГ) описаны в работе Т.В. Русовой и др. [6]. Для характеристики протеогликанов использовали метод электрофореза в 1,2 % геле агарозы в 0,1М трис-ацетатном буфере pH 7,3. Количество моносахаров выражали в микрограммах чистого вещества на миллилитр жидкости. Результаты обрабатывали программой "STATISTICA", используя среднее значение "M", ошибку среднего "m" и t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приведено общее количество химических компонентов ГАГ в СЖ, которое меняется по мере развития дегенеративных изменений в хряще. На ранних стадиях заболевания количество ГАГ в СЖ возрастает (уроновые кислоты и $C_{ГАГ}$), но не столь значительно, как количество галактозы (примерно, в 1,5 раза относительно контрольных значений). В дальнейшем количество $C_{ГАГ}$ и уроновых кислот (УК) снижается, но значительно возрастает количество галактозы и общего белка. У больных со 2-й стадией заболевания, подтвержденной рентгенографически, снижены все определяемые компоненты цепей ГАГ. Это достаточно уникальная стадия заболевания, поскольку разброс полученных аналитических результатов минимален. На поздней (3-й) стадии у подавляющего большинства обследованных (около 75 %) отмечено дальнейшее снижение содержания УК и $C_{ГАГ}$, но у 40 % больных повышено количество галактозы, в некоторых случаях почти на порядок по сравнению с контролем. Примерно у 20 % обследованных в СЖ обнаружено высокое содержание УК. Таким образом, на самой поздней стадии заболевания количество аналитических параметров ГАГ существенно варьирует.

Использование метода осаждения ГАГ из раствора с помощью четвертичного аммонийного основания - ЦПХ позволяет разделить общий пул

ПГ на 2 части – содержащий сульфатированные и низкосульфатированные ГАГ, практически гликопротеиды. Как видно из таблицы, с прогрессированием заболевания увеличивается относительное количество осаждаемых $C_{ГАГ}$ (табл. 1). Одновременно в неосаждаемом пуле растет количество галактозы и уроновых кислот. Методом ионообменной хроматографии на ДЕАЕ А-25 установили, что в этом пуле у больных на поздних стадиях заболевания в СЖ содержится до 90 % общего количества галактозы, гиалуриновая кислота, не связанная с ПГ, и небольшое количество низкосульфатированных ХС-АС и КС. Известно, что количество неосаждаемых низкосульфатированных ГАГ и нейтральных олигосахаридов возрастает в хряще на поздних стадиях АО [6]. Увеличение количества этого пула происходит параллельно процессам ремоделирования суставных тканей. Кроме того, в этот период хондроциты синтезируют модифицированные ГАГ – ХС и КС, в которых снижено содержание сульфатных групп из-за нарушения активности сульфотрансфераз, участвующих в элонгации цепей ГАГ [6, 7, 8]. Вероятно, накопление таких измененных ГАГ связано с особенностью патологического процесса в суставе – с потерей гиалинового хряща и прогрессирующим фиброзом внутрисуставных тканей, в том числе синовиальной оболочки.

Таблица 1
Количество гликозаминогликанов и белка в СЖ (в расчете мкг чистого вещества на 1 мл жидкости, $C_{ГАГ}$ – в мкг хондроитинсульфата С)

| n | Стадия ОА | Уроновые кислоты | Галактоза | $C_{ГАГ}$ | Кол-во осаждаемых $C_{ГАГ}$ (в % от общего) | Белок |
|----|-----------|------------------|----------------|------------|---|-----------|
| 5 | норма | 1070,4±88,9 | 730,4±66,2 | 96,2±10,1 | 57,4±4,32 | 18,8±1,32 |
| 16 | 1 | 1273,5±160,2 | 1040,6±126,65 | 136,7±17,2 | 68,6±5,98 | 23,4±2,69 |
| 18 | 2 | 401,8±36,8 | 268,1±32,12 | 65,0±5,6 | 74,9±8,23 | 34,6±2,82 |
| 56 | 3 | 503,75±75,2 | 1533,05±286,23 | 50,34±5,17 | 84,5±8,02 | 46,7±5,36 |

В норме структура СЖ определяется содержанием высокополимерной гиалуроновой кислоты и большим протеогликаном-агреканом, который синтезируется хондроцитами суставного хряща и поступает в СЖ в виде достаточно больших фрагментов [1]. Этот ПГ обладает участком белка, способным связываться с ГК, благодаря чему образуются большие надмолекулярные агрегаты. Период полужизни агрекана в СЖ человека составляет около 8 час. В суставе с развивающейся патологией скорость обмена ПГ увеличивается еще больше из-за активации ферментов, участвующих в деградации этого ПГ - агреканазы. Увеличение концентрации ГАГ в СЖ в начале заболевания является результатом ускорения нормальной деградации и активации анаболических процессов в суставе [8-11]. Это период быстрого ремоделирования матрикса, который выражается в быстром пополнении его фрагментами ПГ одновременно поступающими в СЖ. Эти фрагменты несут большое количество цепей ХС. С развитием патологического процесса в тканях сустава возрастает активность протеолиза ПГ с участием широкого спектра протеаз – агреканазы, катепсинов, металлопротеаз [12, 13]. В СЖ поступает все больше мелких фрагментов ПГ, в том числе лежащих в глубоких слоях хряща и содержащих цепи кератан сульфата (КС) [14]. В эксперименте показано, что повышенное содержания в СЖ кератан сульфата связано с усилением процессов катаболизма [14, 15]. В динамике развития ОА в осаждаемых ГАГ меняется соотношение хондроитин- и кератан сульфатов. В СЖ контроля и в начале заболевания преобладает ХС – количество галактозы и N – ацетилглюкозамина (структурных единиц КС) на этом этапе незначительно. На поздних этапах заболевания (2, 3-я стадии), примерно, у 30 % больных в структуре ГАГ преобладает КС на фоне низкого уровня УК. У этих больных можно предполагать наличие активной деструкции хряща с

одновременным снижением активности анаболических процессов.

В интактной синовиальной жидкости протеогликаны и гиалуроновая кислота образуют единый комплекс, часть которого осаждается, а часть, из-за избытка ГК, не осаждается ЦПХ (рис. 1, полосы 1, 2, 3). При прогрессировании заболевания СЖ теряет нативную структуру – происходит разрыв связей ПГ – ГК, хотя общее количество $S_{ГАГ}$ практически не меняется. В результате на картине электрофореза четко видно на старте ГК и ушедшие далеко от старта ПГ/ГАГ, появляется свободная высокополимерная ГК, не связанная с ПГ и не осаждаемая ЦПХ (рис. 1, полосы 4, 5). На более поздних стадиях ОА в СЖ короткие фрагменты ПГ/ГАГ уходят далеко от старта, хорошо видны ГАГ, не осаждаемые ЦПХ (рис. 1, полосы 6, 7). Исчезает высокополимерная ГК, обычно остающаяся на старте. Низкополимерная ГК движется вместе с легкими не осаждаемыми ГАГ. Поэтому электрофоретически ее можно регистрировать только после хроматографического разделения смеси (полоса 8). Т.е. с прогрессированием заболевания в СЖ накапливается пул ГАГ, близкий по структуре к олигосахаридам гликопротеинов, снижается количество и полимерность гиалуроновой кислоты. У больных с 3-й стадии ОА в СЖ остаются только короткие обломки ПГ/ГАГ, но все они практически полностью осаждаются ЦПХ (полоса 9, 10). Таким образом, с развитием ОА синовиальная жидкость теряет структурную организацию комплексов ПГ. Снижается их количество, способность образовывать агрегаты как между отдельными ПГ, так и с гиалуроновой кислотой, меняется качественный состав ГАГ, размеры молекул. На поздних стадиях заболевания количество $S_{ГАГ}$ в СЖ крайне низко, в них преобладает галактоза – химический элемент кератан сульфата.

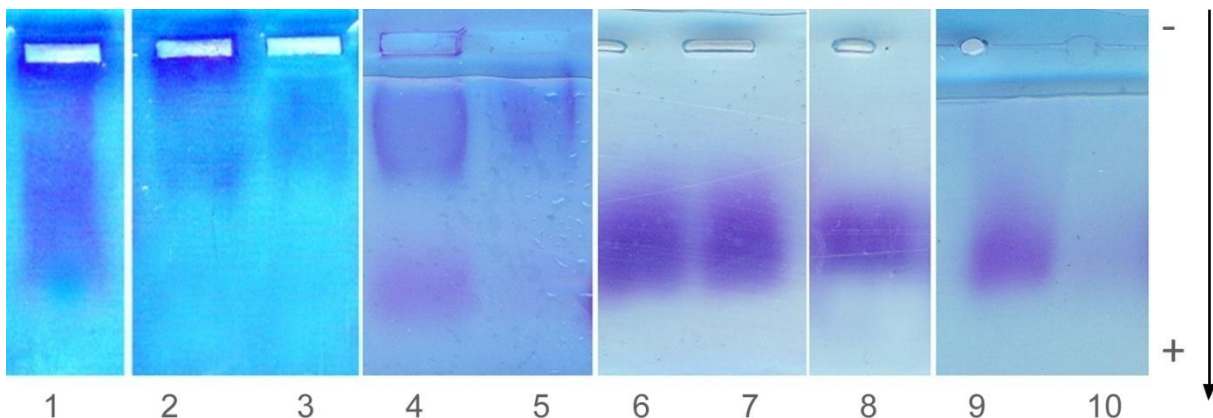


Рис. 1. Протеогликаны синовиальной жидкости коленного сустава. Электрофоретическое разделение в 1,2 % геле агарозы в 0,1 М трис-ацетатном буфере pH 7,3. № 1, 2, 3 – протеогликаны контрольного образца синовиальной жидкости. № 4, 5 – протеогликаны СЖ на ранних стадиях заболевания. № 6, 7 – ПГ/ГАГ, осаждаемые и не осаждаемые ЦПХ (1-2 стадии ОА). № 8 – низкополимерная ГК. № 9, 10 – ПГ из СЖ больных с 3-й стадией остеоартроза

ВЫВОДЫ

1. Активный обмен ПГ/ГАГ между суставным хрящом и СЖ создает предпосылки для создания диагностических биохимических тестов течения и прогнозирования патологического процесса ОА в коленном суставе и позволяет установить ранние проявления заболевания.

2. Комбинация трех аналитических тестов общего содержания ГАГ в СЖ – определение количества гексуриновых кислот, сульфатиро-

ванных гликозаминогликанов и галактозы позволяет диагностировать особенности метаболических процессов на разных стадиях заболевания и прогнозировать течение болезни.

3. Неблагоприятным признаком течения ОА можно считать снижение количества уроновых кислот и сульфатированных ГАГ в СЖ, увеличение содержания галактозы и появление относительно большого количества кератансульфата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sandy J., Verscharen Ch. Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo // *Biochem J.* 2001. Vol. 358. P. 615-625.
2. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments / A. Struglics [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* 2006. Vol. 14. P. 101-113.
3. Heinegard D., Saxne T. Molecular markers of processes in cartilage in joint disease // *Br. J. Rheumatol.* 1991. Vol. 30. P. 21-24.
4. Normal human synovial fluid and articular cartilage contain similar intact proteoglycans / R. Heimer [et al.] // *J. Lab. Invest.* 1992. Vol. 66. P. 701-707.
5. Struglics A., Larsson S., Lohmander L. S. Estimation of the identity of proteolytic aggrecan fragments using PAGE migration and Western immunoblot // *Osteoarthritis Cartilage.* 2006. Vol. 14. P. 898-905.
6. Русова Т. В., Байтов В. С. Биохимические изменения протеогликанов суставного хряща при прогрессирующем остеоартрозе // *Бюл. ВСНЦ СО РАМН.* 2008. № 2. С. 26-30.
7. Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis / A. H. K. Plaas [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 12642-12649.
8. Human articular cartilage proteoglycans are not undersulfated in osteoarthritis / C. J. Qu [et al.] // *Connective Tissue Research.* 2007. Vol. 48. P. 27-33.
9. Lohmander L. S., Neame P. J., Sandy J. D. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint in injury, and osteoarthritis // *Arthritis Rheum.* 1993. Vol. 36. P. 1214-1222.
10. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis / L. S. Lohmander [et al.] // *Ibid.* 1999. Vol. 42. P. 534-544.
11. Use of synovial fluid markers of cartilage synthesis and turnover to study effects of repeated intra-articular administration of methylprednisolone acetate on articular cartilage in vivo / F. C. Robion [et al.] // *J. Orthopaedic Research.* 2001. Vol. 19. P. 250-258.
12. Matrix metalloproteinase and aggrecanase generated aggrecan fragments: implications for the diagnostics and therapeutics of destructive joint diseases / U. Eren [et al.] // *Drug Development Research.* 2007. Vol. 68. P. 1-13.
13. Struglics A. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments // *Osteoarthritis Cartilage.* 2006. Vol. 14. P. 101-113.
14. Ratcliffe A., Beauvais P. J., Saed-Nejad F. Differential levels of synovial fluid aggrecan aggregate components in experimental osteoarthritis and joint disuse // *J. Orthop. Res.* 1994. Vol. 12. P. 464-473.
15. The cleavage of biglycan by aggrecanases. / L. I. Melching [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* 2006. Vol. 14. P. 1147-1154.

Рукопись поступила 18.12.06.

Сведения об авторах:

1. Русова Татьяна Васильевна – к.б.н., ст.н.с. экспериментально-теоретического отдела ФГУ Новосибирского НИИ Травматологии и Ортопедии Росмедтехнологий. Раб. адрес: 630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17, ННИИТО, тел. (383) 224-45-66, факс (3832) 24-55-70, e-mail TRusova@niito.ru; дом. тел. (3832) 60-38-59.
2. Байтов Владислав Сергеевич – м.н.с. отделения эндопротезирования ФГУ Новосибирского НИИ Травматологии и Ортопедии Росмедтехнологий.