

**АННОТИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ
О РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ,
ВЫПОЛНЕННЫХ НА ЭТАПЕ № 1**

«Исследование закономерностей смены спектра, состава и количества протеогликанов в ходе прогрессирования остеоартроза у больных разного возраста»

Соглашение от 23 октября 2012 г. №8301.

Тема: «Роль протеогликанов суставного хряща в динамике развития дегенеративных процессов при остеоартрозе»

Исполнитель: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии ортопедии» Министерства здравоохранения России

Ключевые слова: остеоартроз, протеогликаны, гликозаминогликаны, протеазы, катепсин D, хондроциты

1. Цель проекта

Остеоартроз - самая распространенная форма заболевания суставов, связанная с болью, потерей формы и функции сустава в связи с дегенеративными изменениями в тканях (Carrington J.L. et al, 2005; Horton W.E. et al, 2006). Вопрос о природе развивающихся дегенеративных изменений является спорным: соответствуют ли подобные изменения тканей процессам старения в их ускоренном варианте, или эти изменения носят патологический характер, т.е. метаболические процессы в тканях протекают по-иному и существенно отличаются от геронтологических (Rizkalla G. et al 1992; Martin J. et al.2001, 2003, 2004; Horton WE, et al 2006; Goldring MB, Marcu K.B. 2009, Eustice C.R., 2008). В любом случае, этапы развития обоих процессов связаны с изменением структуры ткани и особенностями обмена молекул в ней. Эксперименты по замене дефектов хрящевой ткани с помощью коллагеновых подложек или с использованием стволовых клеток без учета этих параметров показали, что клетки плохо приживаются в зоне дефекта, а в коллагеновые подложки прорастают сосуды. В результате, использование таких подходов приводит сначала к образованию уступающего по упругим свойствам и способности к истиранию в зоне дефекта фиброзного хряща с последующей его дегенерацией. Протеогликаны, учитывая их способность модулировать активность различных тканевых стимуляторов и ингибиторов, являются не только структурообразующими, но и ключевыми информационными молекулами развития и функционирования хрящевой ткани в целом.

В связи с этим, нами поставлена задача путем исследования структуры протеогликанов и активности расщепляющих их протеаз определить сходство и различие возрастных и дегенеративных изменений в ткани хряща коленного сустава и точки расхождения процессов старения и дегенерации, обусловленные сменой метаболических процессов в резидентных клетках.

2. Основные результаты проекта

Исследование активности протеаз в хрящевой ткани

Наибольшая активность катепсина D обнаружена в наиболее нагружаемом участке коленного сустава- хрящевой поверхности медиального мыщелка большой берцовой кости. В латеральном мыщелке, нагружаемого меньше, активность фермента снижена. В зоне, подвергающейся наименьшей нагрузке - в заднем крае внутреннего мыщелка бедра активность катепсина D выше, чем в зоне средней нагружаемости, но ниже, чем наиболее нагружаемой зоне, возможно, что это связано с большим количеством клеток в области заднего края внутреннего мыщелка бедра по сравнению с зоной средней нагрузки.

Высокая активность катепсина D характерна практически для всех тканей, вовлеченных в патологический процесс и коррелирует со степенью его силы, поэтому наибольшая его активность в зоне наибольшей разрушенности хрящевой ткани была ожидаемой. В работах зарубежных исследователей также показано увеличение количества клеток, экспрессирующих повышенное количество катепсина D и матриксных металлопротеиназ в зоне наибольшего поражения коленного сустава у кроликов (H. Wu et al., 2008), однако сравнение по-разному нагружаемых зон в работах не производилось. Активность катепсина D в хрящевой ткани коленного сустава снижалась у больных остеоартрозом старше 70-ти лет, что, вероятно, связано с вкладом возрастных изменений в процессы дегградации хрящевой ткани (Венедиктова и соавт., 2007). Следует отметить, что активность катепсина D в хрящевой ткани при остеоартрозе не была увеличена чрезмерно, как, например, при различных видах артритов (Ярыгина, 2002). Поэтому было бы перспективным исследование влияния введения различных доз протеолитических ферментов в полость сустава лабораторных животных, либо в культуру хондроцитов с целью выяснения роли внеклеточного присутствия протеаз в изменение функционирования клеток.

Исследование протеогликанов в хрящевой ткани

Исследовали образцы хряща из разных топографических зон коленного сустава больных идиопатическим ОА III степени: 1- задний край внутреннего мыщелка бедра; 2 - латеральный мыщелок большой берцовой кости; 3 – медиальный мыщелок большой берцовой кости ; 4 – поверхность остеофитов. Результаты сравнивали с образцами хряща без признаков остеоартроза, взятого посмертно (45, 50 лет).

Количество сульфатированных гликозаминогликанов во всех зонах хряща снижено относительно контроля и различно в отдельных зонах. Уровень сульфатированных гликозаминогликанов в нативном хряще (зона 1) и остеофитах практически одинаков, в зоне 3 – в дегенерированном хряще - достоверно снижен. В зоне 2 (мало нагружаемом хряще) существует тенденция к снижению относительно уровня нативного хряща (зона 1). Количество уроновых кислот в нативном хряще выше, чем в остальных топографических зонах и сравнимо с уровнем в контрольной группе и остеофитах. Известно, что высокий уровень хондроитинсульфата характерен для гиалинового хряща и молодых, растущих тканей (Glade M.J., 2006). В нашем исследовании даже у людей пожилого возраста с высокой стадией заболевания остеоартрозом существуют участки ткани, соответствующие

по структуре гликозаминогликанов нормальному гиалиновому хрящу, а хондроциты в отдельных зонах обладают синтетической активностью на достаточно высоком уровне для формирования хряща *de novo*. Количество гексоз во всех топографических зонах (кроме остеоцитов) значительно выше контрольного уровня, особенно в мало нагружаемом (зона 2) и дегенерированном хряще (зона 3). Причем основное количество гексоз не связано с гликозаминогликанами, что подтверждается ионно-обменной хроматографией гликозаминогликанов - до 80% гексоз элюируется водой. Эти гексозы могут накапливаться вследствие активации процессов гликирования белков, который может быть инициирован неадекватной биомеханической нагрузкой. Известно, что такие нагрузки в начале процесса дегенерации повреждают ткань матрикса хряща снижая биосинтез протеогликанов и коллагена. Вероятно, накопление гексоз является относительно ранним проявлением метаболических перестроек в ткани.

В исследовании показано, что из нативного и хряща контрольной группы диссоциирующими растворами можно выделить почти 75% сульфатированных гликозаминогликанов, из зоны мало нагружаемого хряща около 60%, то из дегенерированного хряща только 25% общего количества гликозаминогликанов. Следовательно, функционирование ткани в условиях больших нагрузок и дегенерации стимулирует не только потерю гликозаминогликанов но и формирование жесткого коллагенового каркаса. Функциональная морфология хряща тесно связано с количеством гликозаминогликанов. Жесткая сеть коллагена ограничивает экспансивный рост ткани при условии повышения содержания гликозаминогликанов.

Кроме того, в дегенерированном хряще (зона 3) существенно меняются свойства цепей гликозаминогликанов – в них содержится меньше сульфатных групп. Этот факт может отражать нарушение одного из важных посттрансляционных процессов формирования протеогликанов в момент элонгации цепей гликозаминогликанов - снижение присоединение остатков сульфата к цепям гликозаминогликанов. Судя по сообщениям из других лабораторий, подобные нарушения затрагивают преимущественно цепи хондроитинсульфата AC (Glade MJ., 2006; Abramson S.B., 2009). Фундаментальные биологические функции сульфатированных гликозаминогликанов как структурных элементов протеогликанов, расположенных во внеклеточном матриксе и на поверхности клеток, связаны с рецепторным аппаратом клеток и обеспечивают прохождение сигналов факторов роста и хемокинов (Martel-Pelletier J., 2010; Abramson S.B., 2009). Кроме того, такие гликозаминогликаны способны ингибировать активность протеолитических ферментов и других факторов, способствующих повреждению хрящевой ткани и смерти хондроцитов. Снижение сульфатирования гликозаминогликанов изменяет структуру протеогликанов и их свойства, что приводит к нарушению нормальной физиологии ткани. Но сведения об этом процессе в хряще в процессе дегенерации противоречивы: в некоторых исследованиях не обнаружили снижения сульфатирования гликозаминогликанов (Lammi MJ, 2004). В других, обосновано предполагают, что дефицит сульфатирования гликозаминогликанов является одной из причин развития остеоартроза у животных и

человека, оказывая самое разнообразное влияние на обменные процессы в ткани (Chengjuan Qu). Такие противоречивые сообщения связаны с тем, что разные исследователи изучали метаболические процессы на разных этапах развития процесса дегенерации. На ранних этапах изменения хряща минимальны и отличаются от нормальных интенсификацией как катаболизма, так анаболизма гликозаминогликанов. Но с развитием патологического процесса происходят глубокие изменения метаболизма в самих хондроцитах: меняется спектр синтезируемых протеогликанов/ гликозаминогликанов и, в частности, снижение активности ферментов, сопряженных с посттрансляционным формированием сульфатированных гликозаминогликанов. Наши результаты указывают на такую возможность, демонстрируя разное качество гликозаминогликанов в разных топографических зонах сустава.

Предварительные результаты исследования выживаемости и активности хондроцитов показали, что хондроциты, выделенные из высоконагружаемой зоны сустава хуже выживают и хуже делятся по сравнению с клетками, взятыми с наименее нагружаемой зоны.

В результате создания коллагеновых подложек и распространения технологий культивирования клеток, получили развитие операционные техники по замещению точечных дефектов хрящевой ткани с использованием клеточных культур и новых материалов, однако, их применение до сих пор не привело к образованию гиалинового хряща (Kaul et al., 2012), поскольку все эксперименты проведены без учета формирующей роли внеклеточного матрикса. Это свидетельствует о том, что, несмотря на активизацию и/или дифференцировку клеток с помощью различных факторов роста, качество внеклеточного матрикса играет одну из ключевых ролей в функционировании хондроцитов. Наше исследование предполагает изучение молекул, составляющих клеточный матрикс, из различных топографических зон коленного сустава, пораженного остеоартрозом. Каждая из зон сустава нагружается и изнашивается в различной степени, что отражается на состоянии протеогликанов в ней: на их количественном и качественном составе, как показано в настоящем исследовании. Нами не обнаружено публикаций, которые бы изучали молекул, составляющих матрикс хрящевой ткани, и активности разрушающих их ферментов (катепсина D) в зависимости от зоны забора хряща, и, соответственно, - от степени его изменённости патологическим процессом.

Полученные в ходе исследования результаты помогают установить патогенетические механизмы развития остеоартроза коленного сустава и могут быть положены в основу создания импортозамещающих имплантатов для точечной замены дефектов хрящевой ткани.