

УДК 616.728.3-018.3:611.018.2.:577.2.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ПРОТЕОГЛИКАНОВ ИЗ РАЗНЫХ ТОПОГРАФИЧЕСКИХ ЗОН КОЛЕННОГО СУСТАВА У БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ: ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФЕНОТИПА ХОНДРОЦИТОВ

Татьяна Васильевна РУСОВА, Елена Леонидовна СТРОКОВА,
Анастасия Александровна ВОРОПАЕВА, Елена Игоревна ЩЕЛКУНОВА

ФГБУ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

Исследовали содержание и свойства протеогликанов хряща из разных топографических зон коленного сустава у больных идиопатическим остеоартрозом III стадии. В образцах хряща из разных зон исследовали количество протеогликанов и экспрессию основных структурных генов хряща: агрекана, люмикана, версикана, коллагенов типа I и II, а также генов пролиферации и дифференцировки хондроцитов – SOX-9, TGF β -3, TGF β R, KLF4. Содержание и свойства протеогликанов в разных топографических зонах хряща различаются – в зоне с максимальной механической нагрузкой их количество минимально относительно других зон, они более прочно связаны с фибриллами коллагена, более подвижны в электрическом поле и менее агрегированы. Установлено, что клетки всех топографических зон, независимо от выраженности дегенерации и механической нагрузки, сохраняют способность экспрессировать гены основных компонентов внеклеточного матрикса, а также сигнальных белков пролиферации и дифференцировки на одном уровне, однако в наиболее нагружаемой зоне снижена экспрессия гена протеогликана версикана и регуляторного белка KLF4. Таким образом, в хряще разных зон коленного сустава фенотипически различные хондроциты продуцируют протеогликаны, отличающиеся по количеству и свойствам.

Ключевые слова: протеогликаны, экспрессия генов протеогликанов, экспрессия генов пролиферации и дифференцировки хондроцитов, суставной хрящ, остеоартроз.

Остеоартроз – самое распространенное заболевание суставов невоспалительного дегенеративного характера, которое затрагивает все компоненты сустава и связано с локальными, нарастающими со временем, потерями внеклеточного матрикса суставного хряща, основными компонентами которого являются коллаген типа II и протеогликаны (ПГ).

ПГ представляют собой молекулы, состоящие из центральной нити белка (кора) с присоединенными к нему углеводными цепями гликозаминогликанов (ГАГ). Углеводные цепи больших ПГ агрекана и версикана участвуют в сохранении гидратированности хрящевой ткани. Версикан и агрекан при участии линк-белка образуют агрегаты с гиалуроновой кислотой, структурируя внеклеточный матрикс хрящевой ткани [20]. Малый ПГ люмикан участвует в формировании фибрилл коллагена [20]. Потеря ПГ снижает сопротивление ткани к сжатию и предшествует повреж-

дению фибриллярной сети коллагена, которая отвечает за механическую способность ткани к растяжению [6, 16, 18].

Контроль активности экспрессии генов специфических белков хондроцитов осуществляют регуляторные белки TGF β -3, SOX-9 и, как мы предполагаем, KLF4. TGF β -3 является одной из изоформ известного цитокина TGF β , который участвует в дифференцировке клеток, эмбриогенезе и эмбриональном и постнатальном развитии тканей организма [21]. TGF β -3, как полагают, регулируют синтез молекул, участвующих в клеточной адгезии и в формировании внеклеточного матрикса. В то же время он усиливает синтез белков межклеточного матрикса, способствует заживлению ран, оказывает анаболическое действие [20, 21]. Экспрессия SOX-9 обнаружена во всех зачатках хрящей, зрелой хрящевой ткани и совпадает с экспрессией гена α_1 цепи коллагена типа II (COL2A1). SOX-9 рассматривается в ка-

Русова Т.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела,
e-mail: TRusova@niito.ru

Строчкова Е.Л. – научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: EZavyalova@niito.ru

Воропаева А.А. – к.б.н., научный сотрудник Отдела инноваций и интеллектуальной собственности,
e-mail: Voropaeva2011@rambler.ru

Щелкунова Е.И. – научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела, e-mail: EShelkunova@niito.ru

честве первого фактора транскрипции, который необходим для дифференцировки хондроцитов хряща [9]. KLF4 играет ключевую роль в пролиферации и дифференцировке клеток. Это доказано для эпителиальных клеток роговицы и некоторых других тканей (почки, легкие). В клетках хряща экспрессия гена KLF4 не исследовалась.

В настоящее время считается, что разрушение суставного хряща при заболевании остеоартрозом является результатом чрезмерной нагрузки, возрастных изменений и нарушения обмена веществ [6, 18, 19]. В здоровом суставном хряще пролиферативная активность клеток, включение новых синтезированных молекул в каркас матрикса и удаление из матрикса исчерпавших свой ресурс компонентов крайне низки. Вместе с тем клетки хрящевой ткани обладают мощным метаболическим потенциалом, их активация отмечена при развитии патологических состояний, в том числе таких, как остеоартроз [18]. Давление на хрящевые поверхности суставов, соответствующее физиологической норме, стимулирует синтез хондроцитами протеогликанов, которые обеспечивают упругие свойства хряща, подходящие для сопротивления переменным механическим нагрузкам. Вместе с тем механическая нагрузка стойко модулирует экспрессию генов специфических белков хондроцитов [4, 5, 17].

Известно, что при развитии остеоартроза происходит деформирование сустава и возникает так называемая варусная деформация, которая влечет за собой значительное увеличение нагрузки на хрящевую ткань в области медиального мыщелка большой берцовой кости [2]. Это дает основание предполагать, что в различных зонах коленного сустава, испытывающих неодинаковую механическую нагрузку, хондроциты отличаются по фенотипу, что может проявляться в изменениях синтеза количества и типов ПГ.

Таким образом, целью нашего исследования явилось изучение влияния биомеханических нагрузок на фенотип хондроцитов из разных топографических зон коленного сустава у больных остеоартрозом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы хряща из разных топографических зон коленного сустава, испытывающих разную биомеханическую нагрузку, у больных идиопатическим остеоартрозом III степени с варусной деформацией (14 человек, возраст от 65 до 75 лет). После операции эндопротезирования коленного сустава для исследования были отобраны следующие образцы: 1 – задний край внутреннего мыщелка бедра, испытывающий

наименьшую механическую нагрузку (зона не нагружаемого хряща); 2 – латеральный мыщелок (зона малонагружаемого хряща); 3 – медиальный мыщелок большой берцовой кости, расположенный в зоне варусной деформации (нагружаемый хрящ) [1].

ПГ выделяли из ткани последовательным экстрагированием растворами разной ионной силы – 0,14М NaCl (пул 1), 4М гуанидина гидрохлоридом (пул 2). Оставшуюся нерастворенную ткань обрабатывали раствором папаина (пул 3) [2]. ПГ очищали ионообменной хроматографией на сефадексе ДЕАЕ А-25, осаждали спиртом в присутствии 2,5 % ацетата калия, высушивали и растворяли в воде.

Количество ПГ определяли по содержанию в их углеводной части сульфатированных гликозаминогликанов и гексуроновых кислот, гексозы (галактоза) [1], а также белка методом Бредфорд [1]. Структурные особенности ПГ из разных экстрактов определяли по их подвижности в электрическом поле, разделяя их горизонтальным электрофорезом в композитном геле агароза/полиакриламид в 0,1М трис-буфере рН 6,3 [15].

Для определения синтетического потенциала клеток суставного хряща у больных остеоартрозом в разных топографических зонах коленного сустава с помощью ПЦР исследовали экспрессию генов, характерных для дифференцировки, пролиферации (KLF4, SOX-9, TGF β -3), восприимчивости клеток к стимулирующим факторам (TGF β R), а также активность генов коллагенов типа I и II (COL1A1, COL2A1), протеогликанов – агрекана (Acan), люмикана (Lum), версикана (Vcan), гена HAPLN1, кодирующего линк-белок, который обеспечивает связь мономеров агрекана с гиалуроновой кислотой.

Материалом для исследования уровня экспрессии генов служили клетки, выделенные из хрящевой ткани коленного сустава разных топографических зон. Суспензию клеток получали обработкой кусочков хрящевой ткани 1,5 % раствором коллагеназы. РНК выделяли из клеток тризольным методом (TRI reagent, Sigma-Aldrich, США) с последующей обработкой ДНКазой, свободной от РНКаз (Fermentas). ДНК получали в реакции обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы M-MLV (Promega, США) в присутствии праймера Oligo (dT)15 (БИОССЕТ, Россия). Амплификацию фрагментов целевых генов проводили методом ПЦР на амплификаторе TRIO-Thermoblock (Biometra, Германия). В качестве контрольного гена использовался ген «домашнего хозяйства» фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. ПЦР была выполнена с использованием Taq-

Таблица 1

Последовательность праймеров

Название гена	Название праймера	Последовательность праймера	Размер целевого фрагмента, пар оснований	Условия проведения реакции
Acan	ACAN1 1f ACAN1 1r	5'-ATCGTCACCCCCGAGGAGCAG-3' 5'-GGCGCTGGACAAACCCCTCTG-3'	379	3 мин при 95 °С, 30 циклов: 30 с 95 °С, 30 с 58 °С
Vcan	VCAN f VCAN r	5'-ACTGCTTTAAACGACCTGATCGCTGC-3' 5'-TGAGATGGGCACCCTGCAGACGG-3'	360	
Lum	LUM2 f LUM2 r	5'-GTGACTGGGCTGGGTCTCCCC-3' 5'-GGCACTTGGGTAGCTTTCAGGGC-3'	329	3 мин при 95 °С, 30 циклов: 30 с 95 °С, 30 с 60 °С
HAPLN1	HAPLN1f HAPLN1r	5'-GGCAGAACACAGTGCCCGGAGTC-3' 5'-GCGCACTGCAGCCTCAGTAGGAC-3'	317	
COL1A1	COL1A1 f COL1A1 r	5'-ATCCAGCTGACCTTCCTGCG-3' 5'-TGGAAGCCGAATTCCTGGTCT-3'	301	
COL2A1	COL2A1 f COL2A1 r	5'-GAAACCATCAATGGTGGCTTCC-3' 5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACTT-3'	322	
TGF β R	TGFBR f TGFBR r	5'-GGCGAGCGGTCTTGCCATC-3' 5'-CTCAAGGCTTCACAGCTCTGCCA-3'	468	
TGF β -3	TGF f TGF r	5'-GGCTGGCGGAGCACAACGAA-3' 5'-GGGTTGTCGAGCCGGTGTGG-3'	535	
SOX-9	SOX9 f SOX9 r	5'-GCGTCAACGGCTCCAGCAAGA-3' 5'-GGCCTGCAGCGCCTGAAGAT-3'	369	

полимеразы и ген-специфичных праймеров при условиях, указанных в табл. 1. Анализ продуктов ПЦР проводили методом горизонтального геле-электрофореза в 1,5 % агарозном геле в буфере TAE в присутствии бромистого этидия. Сканирование геля проводили в ультрафиолетовом свете с помощью видеосистемы «DNA Analyzer» (Россия).

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (*M*), ошибку среднего арифметического значения (*m*), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы проверить гипотезу о влиянии биомеханических нагрузок на фенотип хондроцитов, мы исследовали содержание и структуру ПГ из разных топографических зон коленного сустава больных остеоартрозом, а также экспрессию генов основных ПГ хряща и факторов пролиферации и дифференцировки хондроцитов.

Количество выделяемых ПГ из разных зон коленного сустава представлено в табл. 2. В зонах 1 и 2 (не нагружаемый и мало нагружаемый хрящ) содержание воды в ткани, белка в ПГ, а также их структурных компонентов – сульфатированных

ГАГ – практически одинаково. Но в зоне малонагружаемого хряща (зона 2) достоверно снижена концентрация глюконовых кислот, входящих в состав хондроитинсульфатов (цепей ГАГ, ответственных за удержание воды), и в 2 раза повышено содержание гексоз.

В зоне нагружаемого хряща содержание всех компонентов достоверно снижается, кроме гексоз, количество которых увеличивается в 2,7 раза по сравнению с ненагружаемой зоной. Эти изменения определяются особенностями течения дегенеративных процессов в разных топографических зонах сустава, под влиянием разных внешних условий, в данном случае – неодинаковой биомеханической нагрузки [1].

Следует подчеркнуть, что в структуре ПГ из разных топографических зон относительное содержание белка снижается от не нагружаемого хряща к нагружаемому. Все это может быть, хотя и косвенно, признаком изменения структуры ПГ, имеющих укороченную центральную нить белка, а также разное количество углеводных цепей, присоединенных к ней.

Накопление нейтральных гексоз, скорее всего, связано с накоплением продуктов конечного гликирования и формированием дополнительных поперечных связей в сети коллагеновых фибрилл, которые обычно сопровождают процессы старения и дегенерации [6, 10]. Таким образом, снижение в хряще соотношения ГАГ/белок и нако-

Таблица 2

Общее количество химических компонентов гликозаминогликанов в хрящевой ткани разных топографических зон коленного сустава больных остеоартрозом III стадии (n = 11)

Исследуемый показатель (содержание)	Зона 1	Зона 2	Зона 3
Вода, %	70,6 ± 1,51	69,1 ± 3,87	58,8 ± 2,89*
Сульфатированные ГАГ, мкг/мг сухой ткани	55,2 ± 6,28	45,6 ± 5,21	19,4 ± 1,12*
Уроновые кислоты, мкг/мг сухой ткани	33,1 ± 3,06	22,4 ± 2,12*	23,4 ± 1,79*
Гексозы, мкг/мг сухой ткани	65,4 ± 6,24	124,5 ± 17,6*	196,8 ± 10,2*
Белок, мкг/мг сухой ткани	10,2 ± 1,25	11,2 ± 1,03	6,6 ± 0,52*

Примечание. Зона 1 – хрящ заднего края внутреннего мыщелка бедра (ненагружаемая зона); зона 2 – мыщелок большой берцовой кости, расположенный в стороне от варусной деформации колена (малонагружаемый хрящ); зона 3 – медиальный мыщелок большой берцовой кости, расположенный в зоне варусной деформации (нагружаемый хрящ).

пление гексоз прямо связано с дегенеративными изменениями хряща в ходе развития заболевания. То есть в коленном суставе больных с III стадией остеоартроза выраженность дегенеративных процессов в разных топографических зонах различается и непосредственно зависит от внешних условий воздействия на сустав, в данном случае – механической нагрузки.

Эффективность выделения ПГ из хряща зависит от структуры ткани и прочности связей в ней. Доступность ПГ для растворителей существенно различается в разных топографических зонах. В качестве количественной характеристики ПГ в данной работе мы приняли содержание в их структуре сульфатированных ГАГ.

Наиболее слабым растворителем – 0,14М раствором NaCl – выделяются ПГ, еще не вошедшие в состав структур внеклеточного матрикса, т.е. это могут быть недавно синтезированные протеогликаны [13]. 4М раствор гуанидина гидрохлорида позволяет выделить ПГ, включенные посредством различных связей в функционально активный внеклеточный матрикс. Оставшиеся ПГ, доступные только после полного разрушения белковых структур матрикса, скорее всего, участвуют в формировании «базовых» структур, в которых преобладают белковые образования с прочными поперечными связями. Соотношение этих трех групп (пулов) ПГ отличается в разных топографических зонах (рис. 1).

Так, в не нагружаемой зоне хряща (зона 1) основное количество ПГ экстрагируется 4М раствором гуанидина гидрохлорида (см. рис. 1), практически одинаково (9–10 %) выделяется 0,14М NaCl и папаином, т.е. количество ПГ, слабо связанных со структурами внеклеточного матрикса, и тех, что прочно фиксированы поперечными связями с белковыми структурами в глубоких слоях ткани, равно.

В малонагружаемом хряще (зона 2) в сравнении с другими топографическими зонами уро-

вень ГАГ относительно высок – 20 % всех сульфатированных ГАГ выделяется 0,14М раствором NaCl (пул 1). Основное количество ПГ в этой зоне можно экстрагировать 4М раствором гуанидина гидрохлорида (пул 2) и после разрушения ткани папаином (пул 3). Относительное количество ПГ в этих пулах практически одинаково и составляет около 40 %.

В зоне хряща со стороны варусной деформации, испытывающего максимальную механическую нагрузку (зона 3), основное количество ПГ (75 %) прочно фиксировано в структурах ткани и выделяется только после обработки ткани папаином (пул 3). Оставшиеся ПГ (примерно 25 %) поровну распределены между пулами 1 и 2.

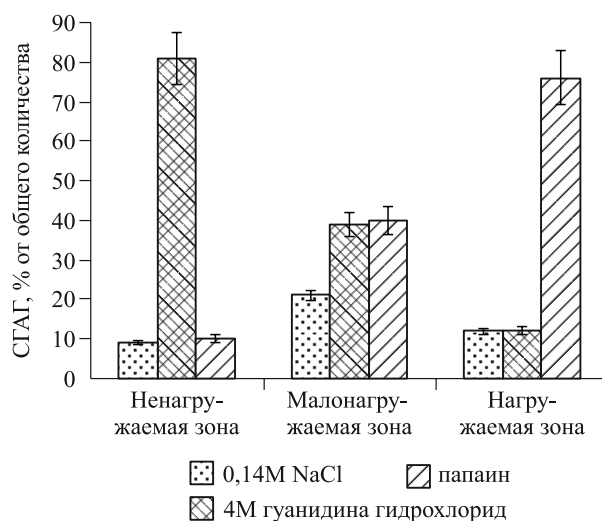


Рис. 1. Распределение сульфатированных ГАГ между пулами протеогликанов суставного хряща, выделяемых из разных зон коленного сустава больных остеоартрозом III стадии последовательно разными растворителями – 0,14 М NaCl, 4 М гуанидина гидрохлоридом, раствором папаина. СГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

Таким образом, в хряще из разных зон колennого сустава у больных остеоартрозом с III стадией заболевания метаболические процессы существенно различаются, что отражается на доступности ПГ для экстракции разными растворителями. Но даже в остатках хряща, который подвержен максимальным механическим нагрузкам, часть ПГ можно выделить 0,14М раствором NaCl, что, вероятно, свидетельствует о присутствии в этой зоне новосинтезированных молекул. Надо подчеркнуть общую закономерность: чем выше механическая нагрузка и активнее течение дегенеративных процессов, тем больше относительный объем труднодоступных ПГ, т.е. тем многочисленнее поперечные связи в структурных элементах ткани не только за счет накопления конечных продуктов гликирования белков, но и за счет преобладания коллагена. Причины такого различия, возможно, связаны с изменением фенотипа хондроцитов, продуцирующих ПГ и коллагены различного типа [8, 11, 17, 18], под влиянием как заболевания, так и вмешательством внешних воздействий на хрящ колennого сустава.

Разделение ПГ методом вертикального электрофореза в композитном геле агароза/полиакриламид в 0,1М трис-буфере pH 6,3 позволяет выявить структурные различия ПГ из разных топографических зон при условии разной подвижности в электрическом поле в зависимости от размеров молекул и их электрического заряда (рис. 2).

Подвижность ПГ в электрическом поле из различных топографических зон, выделяемых 0,14М раствором NaCl (пул 1), различается. Если

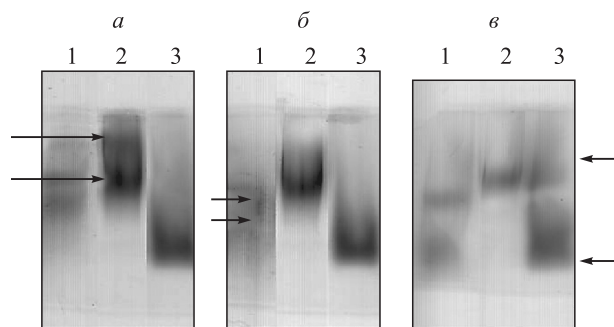


Рис. 2. Электрофоретическое разделение разных пулов ПГ, выделенных последовательно разными способами: 1 – с помощью экстракции 0,14М NaCl; 2 – с помощью экстракции 4М гуанидина гидрохлоридом; 3 – с помощью обработки ферментом (папаином). а – ПГ выделены из ненагружаемого хряща; б – ПГ выделены из малонагружаемого хряща; в – ПГ из нагружаемого хряща. Стрелками указаны отдельные выделенные полосы разделения молекул ПГ

ПГ этого пула из ненагружаемого хряща движутся единой полосой (см. рис. 2, а, дорожка 1), то в малонагружаемом (см. рис. 2, б, дорожка 1) и наиболее нагружаемом хряще (см. рис. 2, в, дорожка 1) обнаружено разделение на 2 полосы. При этом в нагружаемой зоне колennого сустава молекулы разделяются на 2 полосы более четко, чем в малонагружаемой, и, как видно по рисунку, количество легких молекул больше в зоне, испытывающей наибольшую нагрузку.

ПГ пула 2, выделяемые 4М раствором гуанидина гидрохлоридом, во всех топографических зонах одинаково «тяжелые» относительно других пулов ПГ. Подвижность экстрагируемых таким образом ПГ из зоны ненагружаемого хряща (см. рис. 2, а, дорожка 2) отличается от подвижности молекул из других зон (см. рис. 2, б, в, дорожки 2). Эти ПГ являются «агрегированными» и разделяются на более «легкую» и более «тяжелую» фракции, отсутствующие в данном пуле, выделенном из других зон колennого сустава.

Третий пул ПГ, которые выделяются после разрушения ткани папаином из зон ненагружаемого и малонагружаемого хряща, представлен одинаково «легкими» молекулами (см. рис. 2, а, б, дорожки 3). Но в зоне нагружаемого хряща наряду с такими «легкими» молекулами содержатся и более «тяжелые» (см. рис. 2, а, дорожка 2).

Таким образом, ПГ из разных топографических зон колennого сустава, при разделении их с помощью электрофореза демонстрируют как общие, так и индивидуальные свойства для каждого пула. Такую гетерогенность молекулярного состава протеогликанов, которая подтверждается измененным составом их углеводной части – ГАГ [1], можно объяснить вариабельностью фенотипа функционирующих хондроцитов, причем в каждой топографической зоне этот фенотип специфичен. Известно, что в постнатальном развитии суставного хряща вследствие неодинакового распределения механических нагрузок в суставе формируются популяции фенотипически различных хондроцитов [4, 17]. Такое фундаментальное свойство хондроцитов сохраняется у больных остеоартрозом и обеспечивает хрящевому покрытию адаптацию к переменным биомеханическим нагрузкам в различных зонах сустава. «Легкие» молекулы ПГ, обнаруживаемые в виде отдельных полос на электрофореграмме, могут появляться вследствие двух разнонаправленных процессов: либо в результате накопления молекул малых размеров – декорина, бигликана, люмикана, что происходит с возрастом [8], либо вследствие активных катаболических процессов в тканях колennого сустава при развитии остеоартроза [3, 8], которые сопровождаются увели-

чением содержания в хряще продуктов распада больших молекул. Наши данные подтверждают накопление низкомолекулярных ПГ, поскольку в нагружаемых зонах возрастает относительное количество кератансульфата [1], который является составной частью низкомолекулярных ПГ [14], т.е. в хрящевой ткани меняется состав ГАГ. Возможно также, что это связано с одновременным увеличением активности катаболических процессов в тканях коленного сустава при развитии дегенеративных процессов [3, 8], приводящих к накоплению в хряще продуктов распада больших молекул.

В ходе исследования потенциальной синтетической активности клеток из различных топографических зон коленного сустава было обнаружено, что независимо от степени нагрузки и, соответственно, дегенерации в хрящевой ткани суставов, в хондроцитах больных остеоартрозом сохраняется активность генов структурных компонентов внеклеточного матрикса: основного ПГ хряща агрекана, участвующего в формировании коллагеновых фибрил малого ПГ люмикана, а также гена линк-белка HAPLN1, который связывает большой ПГ агрекан с гиалуроновой кислотой и таким образом способствует формированию больших агрегатов молекул (рис. 3). Кроме того, сохраняется экспрессия генов пролиферации и дифференцировки клеток SOX-9, $TGF_{\beta-3}$ и гена рецептора $TGF_{\beta-3}$ ($TGF_{\beta-R}$).

Отсюда следует, что в условиях выраженных дегенеративных изменений даже в тонком слое хряща, сохраненном на границе с костной поверхностью большой берцовой кости, в оставшихся живых клетках экспрессируются гены не только молекул его структурных компонентов хряща, но и сигнальных белков пролиферации и дифференцировки. Ген SOX-9 играет важнейшую роль в регуляции образования хряща и дифференцировке хондроцитов, его продукт активирует экспрессию гена коллагена типа II и других, специфических для хряща генов [9, 12]. Некоторые авторы отмечают снижение уровня экспрессии SOX-9 в хряще больных остеоартрозом [9], однако в нашем исследовании это не подтвердилось. $TGF_{\beta-3}$ и его рецептор принимают участие в запуске биосинтеза хондроцитами молекул внеклеточного матрикса [20]. Сохраняющие свою активность гены регуляторных белков – фактора пролиферации хондроцитов SOX-9, цитокина $TGF_{\beta-3}$ и его рецептора, вероятно, поддерживают и регулируют процессы синтеза молекул внеклеточного матрикса хрящевой ткани даже в участках ткани, подверженных наибольшему дегенеративным изменениям. Вероятно, экспрессия совокупности этих генов вносит свой вклад в способность со-

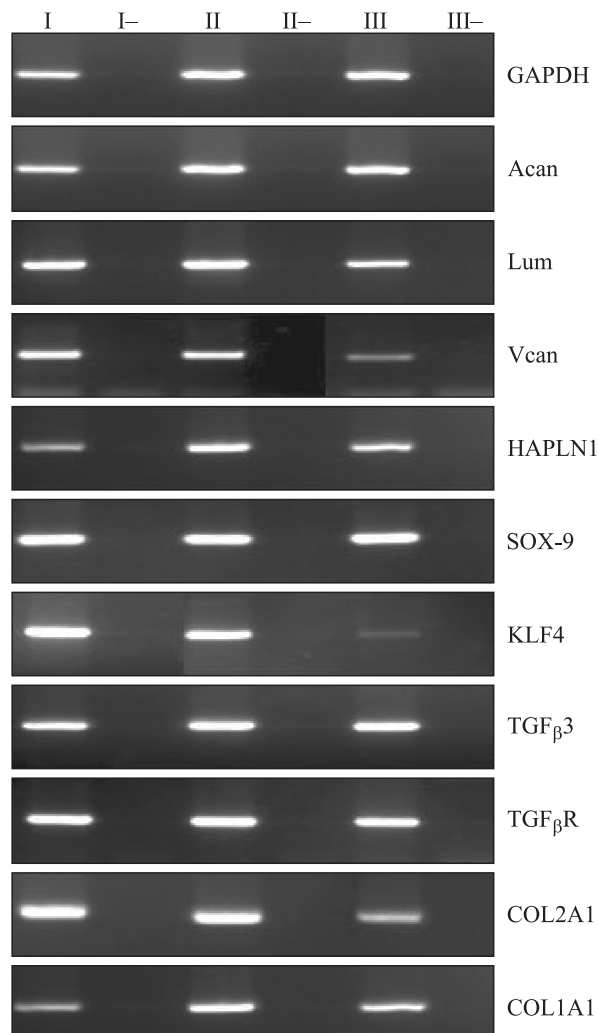


Рис. 3. Экспрессия генов в хрящевой ткани пациентов, больных артрозом. Условные обозначения: I – ненагружаемый хрящ, II – малонагружаемый хрящ, III – нагружаемый хрящ; I-, II-, III- отрицательный контроль

хранившихся клеток из разных зон сустава в определенной мере поддерживать активные метаболические процессы, потенциал пролиферации, дифференцировки и восприимчивости клеток к регуляторным внешним сигналам даже в наиболее патологически измененном хряще, по крайней мере какое-то время.

Тем не менее прогрессирующее ухудшение состояния хрящевой ткани свидетельствует о причастности к процессу дегенерации хряща других факторов. В нашем исследовании обнаружено, что в зависимости от действующей нагрузки в хрящевой ткани больных остеоартрозом происходят изменения экспрессии по крайней мере четырех генов, два из которых кодируют структурные белки матрикса – коллагены I и II типа, один кодирует регуляторный белок, а продукт

четвертого входит в состав молекулы, несущей как регуляторную, так и структурную функцию. Так, нами установлено, что в зоне нагружаемого хряща, подвергнувшегося наибольшей дегенерации, относительно двух других зон снижена экспрессия гена основного структурного белка хрящевой ткани коллагена II типа (см. рис. 3). Экспрессия гена коллагена I типа, являющегося минорным компонентом хрящевой ткани, повышалась в малонагружаемом хряще и имела тенденцию к уменьшению в наиболее нагружаемом участке хрящевой ткани (см. рис. 3). Кроме того, в нагружаемой зоне несколько понижена экспрессия ПГ версикана (см. рис. 3), способного выполнять структурную и регуляторную функцию [20], и существенно снижена экспрессия регуляторного гена *KLF4* (см. рис. 3), ответственного за пролиферацию и дифференцировку клеток. Уменьшение экспрессии указанных генов может служить как причиной выраженной дегенерации хрящевой ткани именно в этой зоне коленного сустава, так и ее следствием, однако, несомненно, является звеном патогенеза остеоартроза и поэтому требует дальнейшего изучения.

Таким образом, установлено, что в каждой топографической зоне коленного сустава больных остеоартрозом хрящевая ткань обладает определенной спецификой обменных процессов и состава внеклеточного матрикса. Известно, что остеоартроз проявляется в потерях не только молекул из ткани хряща, но и хрящевого покрытия костных поверхностей в целом [3–6]. Необходимо подчеркнуть, что хондроциты хряща здоровых и пораженных остеоартрозом суставов проявляют одинаковую синтетическую активность, продуцируют сравнимые количества макромолекул независимо от возраста или болезни [7]. Поэтому снижение числа хондроцитов в хряще с возрастом и при развитии остеоартроза суставов может быть решающим фактором в ограничении количества поступающих в матрикс вновь синтезированных макромолекул и репаративных возможностей ткани, провоцирующих прогрессирование заболевания [7].

У больных тяжелой формой остеоартроза в хряще коленного сустава сохраняются активные метаболические процессы: синтезируется ряд ключевых компонентов внеклеточного матрикса и регуляторных белков активации, пролиферации и дифференцировки хондроцитов, молекулы ПГ – одного из основных компонентов матрикса хряща, в хондроцитах экспрессируются гены основного белка хряща коллагена типа II и гены пролиферации и дифференцировки хондроцитов. Эти процессы отмечены в хряще всех исследованных зон коленного сустава, испытыва-

ющих разную биомеханическую нагрузку – от максимально сохранившейся ткани в стороне от активной двигательной нагрузки до минимально сохранившейся ткани в области варусной деформации сустава. Тем не менее, по всей вероятности, существенное снижение экспрессии гена регуляторного белка *KLF4* и гена составной части структурного ПГ хряща версикана вместе с постоянно возрастающей в ходе дегенерации нагрузкой на хрящевую ткань являются факторами, связанными с прогрессированием остеоартроза, и свидетельствуют о специфике функционирования хондроцитов из этой зоны.

Топографическое разнообразие структуры протеогликанов, выявленное в настоящем исследовании, также предполагает фенотипическую спецификацию хондроцитов в зависимости от топографической зоны коленного сустава, в которой они локализованы. Биомеханические напряжения оказывают существенное влияние на все стороны физиологических процессов в ткани хряща. Очевидно, что совокупность внешних и внутренних регуляторных и метаболических влияний в конечном итоге приводит у больных остеоартрозом к перерождению ткани гиалинового хряща в ткань с иной структурой и иными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании выявлено, что у больных с тяжелой формой идиопатического остеоартроза (III стадия заболевания) в хряще разных топографических зон коленного сустава, возникающих под влиянием неодинаковой биомеханической нагрузки, содержание и структура протеогликанов значительно различаются. В зоне максимальной нагрузки (относительно минимально нагружаемой зоны) снижается содержание ПГ и накапливаются молекулы малых размеров, обладающие высокой подвижностью при разделении их в электрическом поле. Свойства молекул ПГ непосредственно связаны с особенностью строения ткани в каждой топографической зоне. При этом в клетках всех топографических зон одинаково экспрессируются гены основных структурных элементов хряща – коллагена и агрекана, а также гены сигнальных белков пролиферации и дифференцировки клеток, т.е. даже в условиях тяжелых дегенеративных изменений в хряще резидентные клетки сохраняют жизнеспособность и потенциал синтетической активности. Возможно, что снижение уровня экспрессии гена версикана и *KLF4* в зоне, испытывающей наибольшую механическую нагрузку, влияет на прогрессирующее поражение хрящевой ткани при данном заболевании. Неодинаковая биомехани-

ческая нагрузка в разных топографических зонах коленного сустава определяет фенотип хондроцитов данной зоны, которые формируют хрящ, способный максимально адекватно соответствовать внешним влияниям. Такие фенотипические различия определяют особенности структуры ПГ в разных топографических зонах единого коленного сустава.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования Российской Федерации по Федеральной целевой программе «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., Соглашение о предоставлении гранта № 8301.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Русова Т.В., Баумов В.С. Структура гликозаминогликанов суставного хряща у больных остеоартрозом: влияние топографии коленного сустава // Бюл. СО РАМН. 2012. 32. (2). 54–60.
2. Русова Т.В., Баумов В.С. Биохимические изменения протеогликанов суставного хряща при прогрессирующем остеоартрозе // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2008. (2). 26–30.
3. Abramson S.B., Attur M. Developments in scientific understanding of osteoarthritis // Arthritis Res. Ther. 2009. 11. (3). 227–235.
4. Aigner T., Dudhia J. Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis // Ann. Rheum. Dis. 1997. 56. 287–291.
5. Aigner T., Söder S., Gebhard P.M. et al. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis – structure, chaos and senescence // Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2007. 7. 391–399.
6. Anderson A.S., Loeser R.F. Why is osteoarthritis an age-related disease? // Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol. 2010. 24. (1). 15–25.
7. Bobacz K., Erlacher L., Smolen J. et al. Chondrocyte number and proteoglycan synthesis in the aging and osteoarthritic human articular cartilage // Ann. Rheum. Dis. 2004. 63. 1618–1622.
8. Cs-Szabo G., Ragasa D., Berger R.A., Kuettner K.E. The many faces of osteoarthritis. Berlin, 2002. 489 p.
9. Cucchiaroni M., Thurn T., Weimer A. et al. Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX-9 // Arthritis Rheum. 2007. 56. (1). 158–167.
10. DeGroot J., Verzijl N., Wenting-van Wijk M.J., et al. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis // Arthritis Rheum. 2004. 50. 1207–1215.
11. Dejica V.M., Mort J.S., Laverty S. et al. Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage // Arthritis Res. Ther. 2012. 14. (3). R113.
12. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders // Arthritis Res. Ther. 2010. 12. (5). 216–224.
13. Hardingham T.E., Muir H. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation // Biochem. J. 1974. 139. 565–581.
14. Hardingham T.E., Fosang A.J. Proteoglycans: many forms and many function // FASEB J. 1992. 6. 861–870.
15. Iozzo R.V. Cartilage and smooth muscle cell proteoglycans detected by affinity blotting using biotinylated hyaluronan // Methods Mol. Biol. 2000. 171. 53–66.
16. Kurz B., Lemke A.K., Fay J. et al. Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury // Ann. Anat. 2005. 187. 473–485.
17. Little C.B., Ghosh P. Variation in proteoglycan metabolism by articular chondrocytes in different joint regions is determined by post-natal mechanical loading // Osteoarthritis Cartilage. 1997. 5. (1). 49–62.
18. Loeser R.F. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis // Clin. Geriatr. Med. 2010. 26. (3). 371–386.
19. Loeser R.F. Aging cartilage and osteoarthritis – what’s the link? // Curr. Opin. Rheumatol. 2011. 23. (5). 492–496.
20. Settembre C., Arteaga-Solis E., McKee M.D. et al. Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification // Genes Dev. 2008. 22. 2645–2650.
21. Van Osch G.J., van der Veen S.W., Buma P., Verwoerd-Verhoef H.L. Effect of transforming growth factor-beta on proteoglycan synthesis by chondrocytes in relation to differentiation stage and the presence of pericellular matrix // Matrix Biol. 1998. 17. (6). 413–424.

SPECIFIC METABOLISM OF PROTEOGLYCANS FROM DIFFERENT TOPOGRAPHICAL ZONES OF THE KNEE IN PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS: THE VARIABILITY OF CHONDROCYTES PHENOTYPE

**Tatyana Vasilievna RUSOVA, Elena Leonidovna STROKOVA,
Anastasiya Aleksandrovna VOROPAEVA, Elene Igorevna SHCHELKUNOVA**

*Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsyvjan
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

The content and properties of cartilage proteoglycans from different topographical zones of knee joint of patients with idiopathic knee osteoarthritis (OA) of Grade III were investigated. The expression of cartilage main structural genes – proteoglycans (PG) – aggrecan, lumikan, versican, collagens type I and II, as well as proliferation and differentiation genes of chondrocytes – SOX-9, TGF β -3, TGF β R, and KLF4 were examined in the cartilage specimens from these zones. The content and properties of proteoglycans differ between topographical zones: the zone with maximum mechanical load has minimal PG level. They are more firmly bounded to the collagen fibrils, more flexible in electric field and less aggregated. It has been revealed that the cells from all topographic zones despite the degeneration degree and mechanical load retain the capability to express genes of main components of extracellular matrix as well as signal proteins of proliferation and differentiation at the same level. However, the gene expression of proteoglycan versican and regulatory protein KLF4 was reduced in the most loaded zone. Thus, the phenotypical variant chondrocytes produce proteoglycans differing in quantity and property in varied zones of the knee cartilage.

Key words: proteoglycans, proteoglycans genes expression, chondrocyte differentiation and proliferation gene expression, articular cartilage, osteoarthritis.

*Rusova T.V. – candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory-experimental department,
e-mail: TRusova@niito.ru*

Strokova E.L. – researcher of the laboratory-experimental department, e-mail: EZavyalova@niito.ru

*Voropaeva A.A. – candidate of biological sciences, researcher of the innovations and intellectual property department,
e-mail: Voropaeva2011@rambler.ru*

Shchelkunova E.I. – researcher of the laboratory-experimental department, e-mail: EShelkunova@niito.ru