

Т.В. Русова, В.И. Рыкова, А.В. Корель, А.М. Зайдман

## СТРУКТУРА ПРОТЕОГЛИКАНОВ ПЛАСТИНКИ РОСТА ТЕЛ ПОЗВОНКОВ У БОЛЬНЫХ ИДИОПАТИЧЕСКИМ СКОЛИОЗОМ

ФГУ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии Росздрава  
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Идиопатический сколиоз (ИС) проявляется латеральной деформацией позвоночника у детей в период активного роста. Патогенетический механизм формирования деформации позвоночника может быть связан с изменениями молекул протеогликанов (ПГ) — одного из главных компонентов внеклеточного матрикса хрящевой ткани позвоночника. Цель работы — выявить особенности ПГ пластинки роста у больных ИС. Установлено, что у больных ИС 1 — изменяется взаимодействие ПГ с белками межклеточного матрикса, в результате чего основная часть ПГ, по сравнению с контролем, не экстрагируется из ткани в диссоциирующих условиях, а выделяется только после гидролиза ткани папаином; 2 — большая часть углеводных цепей ПГ представлена кератансульфатом, дисахаридные единицы которого мало модифицированы; 3 — указанные особенности ПГ у больных ИС наиболее выражены на вогнутой стороне деформации позвоночника; 4 — качественные и количественные изменения ПГ пластинки роста являются факторами нарушения процессов роста с вогнутой стороны кривизны позвоночника.

**Ключевые слова:** протеогликаны, пластинка роста, идиопатический сколиоз

Идиопатический сколиоз (ИС) — латеральное искривление позвоночника, которое клинически проявляется у детей в период активного роста. Эта болезнь известна много веков, но до настоящего времени нет четкого представления о механизмах развития патологии. Известно, что структурной основой роста позвоночника является пластинка роста. Нарушение структурной организации этой ткани является одним из факторов формирования и прогрессирования деформации позвоночника у больных ИС [2, 14]. Пластинка роста представляет собой хрящевую ткань, в которой одним из основных компонентов матрикса являются протеогликаны (ПГ). ПГ — сложные молекулы, состоящие из ковалентно связанных между собой центральной нити белка (кора) и полисахаридных цепей — гликозаминогликанов (ГАГ). Существует огромное разнообразие молекул ПГ, которые различаются по количеству цепей ГАГ на одном белковом коре, длиной цепей ГАГ, составом дисахаридных единиц и степенью их модификации. Соотношения разных ГАГ и их модификации определяют тканевую специфичность состава ПГ и их функции [11]. Состав ПГ в тканях изменяется с возрастом, при разных патологиях, в том числе и при ИС. Но сведения об изменении ПГ у больных ИС в основном относятся к хрящевым тканям межпозвоночных дисков [3, 7, 15]. ПГ пластинки роста (ПР) больных ИС исследованы недостаточно, только в отдельных работах отмечено снижение количества ГАГ и воды с од-

новременным увеличением содержания общего белка и коллагена [8, 17]. Исследуя ПГ пластинки роста тел позвонков у больных ИС, мы обнаружили значительные изменения состава и структуры углеводных цепей: увеличение количества кератансульфата, большая часть которого была не модифицирована [1]. Поскольку структура этих веществ во многом определяет архитектонику и функциональные свойства хрящевой ткани, то ее нарушение способствует развитию сколиотической деформации позвоночника. Целью данного исследования является изучение особенностей структуры ПГ матрикса пластинки роста у больных ИС.

### Методика исследования

Пластинки роста (50 образцов) были анатомически выделены из материала, полученного после оперативной коррекции деформации позвоночника больных идиопатическим сколиозом III-IV степени в клинике института (возраст 12-14 лет). Дополнительно с разных сторон кривизны позвоночника — выпуклой и вогнутой — исследованы 18 пластинок роста. Для контроля использовали секционный материал судмедэкспертизы (16 случаев того же возраста) из того же уровня позвоночника, что и у больных ИС.

Для выделения ПГ ткани обрабатывали 4 М гуанидин-гидрохлоридом (Г-НCl) в 0,05 М ацетатном буфере pH 5,8 в присутствии ингибиторов (0,01М ЭДТА, 0,005М фенилметилсульфонил-флюорид, 0,1М 6-аминокапроновая кислота,

0,005М солянокислый бензамидин) в течение 48 час при +4 °С (ПГ<sub>1</sub>). После исчерпывающей экстракции 4 М Г-НСl оставшуюся ткань обрабатывали раствором папаина с добавлением 0,01М ЭДТА и 0,005 М цистеина в буфере 0,2 М ацетата натрия рН 5,8 (60 °С, 18 часов, 0,2 мг папаина на грамм сырой ткани) (ПГ<sub>2</sub>). Растворы ПГ<sub>1</sub> и ПГ<sub>2</sub> диализовали против буфера 0,05 М ацетата натрия с 0,01М ЭДТА рН 5,8 (+4 °С, 24 часа). Белки из экстрактов осаждали ТХУ (5% конечная концентрация) и удаляли центрифугированием (9000 g, +2 °С, r<sub>с</sub> = 8 см). После повторного диализа ПГ осаждали тремя объемами этанола в присутствии 4% ацетата калия (-18 °С, 24 часа), осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом, ацетоном и растворяли в воде. Состав и количество ПГ определяли по присутствию уроновых кислот (общепринятый метод с карбазолом), галактозы (общепринятый метод с антроном), сульфатированных ГАГ, ацетилированных и не ацетилированных глюкозамина и галактозамина [5, 9, 12]. В качестве стандартов использовали хондроитинсульфат-С и кератансульфат. Результаты обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента. Электрофорез проводили в 1,2% геле агарозы в 0,1М трис-ацетатном буфере рН 7,3. В этих условиях ПГ разделяются по молекулярным размерам [4].

### Результаты

Сравнительный анализ ПГ, выделенных из пластинок роста тел позвонков контрольных и опытных образцов ткани, показал, что они состоят из двух пулов — ПГ<sub>1</sub> и ПГ<sub>2</sub> (см. методы). Оказалось, что основную часть ПГ в контрольной группе составляют ПГ<sub>1</sub> (около 70% от общего содержания ПГ в ткани), в то время как у больных ИС основная часть ПГ содержится в виде ПГ<sub>2</sub> (около 70%) (Рис. 1). В обоих пулах меняется соотношение основных типов ГАГ — хондроитинсульфатов (ХС) и кератансульфата (КС) (Рис. 1). Так, если в контроле соотношение ХС/КС в ПГ<sub>1</sub> составляет 3:1, а в ПГ<sub>2</sub> — 1,17:1, то у больных ИС эти ГАГ соотносятся как 0,75:1 и 0,42:1 соответственно (Рис. 1 а, б).

Известно, что важную функциональную роль в молекулах ПГ играет модификация углеводных цепей, в том числе сульфатирование и ацетилирование. Ранее было показано, что в пластинке роста содержание суммарных сульфатированных ГАГ при ИС снижается и увеличивается количество неацетилированных аминокислот [1]. В настоящей работе мы ввели показатель «степени сульфатирования ГАГ», который характеризует количество сульфатированных дисахаридных единиц на условную единицу ГАГ (отношение количества

С-ГАГ к суммарному содержанию ХС и КС, выраженное в процентах). Степень сульфатирования ГАГ у больных ИС в ПГ<sub>1</sub> уменьшается более чем в 2 раза (примерно с 70% в контроле до 30% у больных ИС), а в ПГ<sub>2</sub> — в 7 раз (с 34,3% в контроле до 5% у больных ИС) (Рис. 1). В контрольной группе содержание ацетилированных аминокислот снижается на 10% только в ПГ<sub>2</sub>, тогда как у больных ИС их количество снижено в ПГ<sub>1</sub> на 12,5%, а в ПГ<sub>2</sub> — почти на 50% (на рисунке не отражено), причем в пуле неацетилированных аминокислот преобладает глюкозамин. Т.е. нарушение процессов модификации ГАГ (сульфатирование и ацетилирование) более значительно затрагивает КС, вплоть до появления крупных цепей немодифицированного кератана, которые хорошо выявляются электрофорезом и остаются устойчивыми к действию специфических ферментов, разрушающих ГАГ [8]. Появление большого количества немодифицированных аминокислот может быть связано со снижением активности ацетилаз и сульфатаз, участвующих в модификации ГАГ в процессе синтеза ПГ.

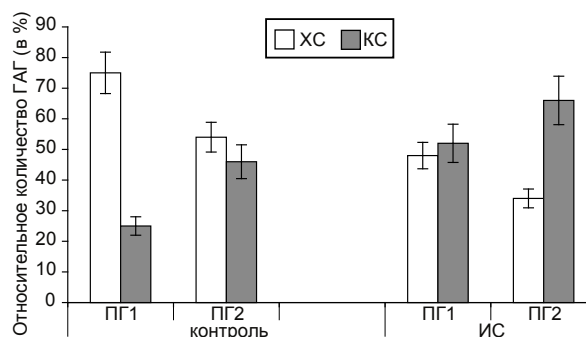


Рис. 1а. Сравнительная характеристика протеогликанов (ПГ) пластинки роста тел позвонков в контрольной группе и больных ИС. Относительное содержание хондроитинсульфата (ХС) и кератансульфата (КС) в разных пулах ПГ

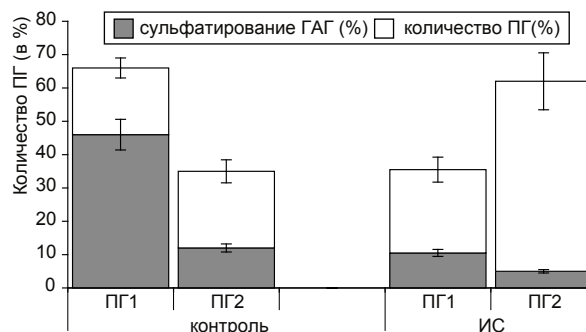


Рис. 1б. Сравнительная характеристика протеогликанов (ПГ) пластинки роста тел позвонков в контрольной группе и больных ИС. Относительное содержание ПГ разных пулов и степень их сульфатирования в контрольной группе (ИС) (ПГ<sub>1</sub> — выделены из ткани 4М гуанидин-гидрохлоридом, ПГ<sub>2</sub> — после обработки оставшейся ткани папаином)

Таблица

**Характеристика протеогликанов пластинки роста тел позвонков с разных сторон кривизны позвоночника больных ИС (выход ПГ рассчитан в мкг на мг сырого веса ткани. В скобках указано относительное количество пула ПГ<sub>2</sub> в % от общего количества)**

Исследуемые параметры	Выпуклая сторона деформации		Вогнутая сторона деформации	
	n=18		n=18	
	ПГ <sub>1</sub>	ПГ <sub>2</sub>	ПГ <sub>1</sub>	ПГ <sub>2</sub>
Выход ПГ (ХС+КС)	18,4±2,25	38,2±3,89* (63,5±3,62(%))	10,2±1,56* <sup>1</sup>	28,8±1,74* <sup>1,2</sup> (74,1±6,85(%))
Отношение ХС/КС	1,28 + 0,098	0,75 + 0,058*	0,81 + 0,065* <sup>1</sup>	0,59 + 0,041* <sup>1,2</sup>
Степень сульфатирования (%)	30,2±2,78	5,7±0,65*	18,4±0,15* <sup>1</sup>	7,7±0,84* <sup>2</sup>

Условные обозначения: \* — достоверное различие  $p < 0,05$ ; \*<sup>1</sup> — достоверное различие с аналогичным пулом выпуклой стороны; \*<sup>2</sup> — достоверное различие с ПГ<sub>1</sub> вогнутой стороны. ХС — хондроитинсульфат; КС — кератансульфат.

Искривление позвоночника у больных ИС формируется за счет уменьшения высоты тел позвонков и межпозвоночных дисков на вогнутой стороне деформации по сравнению с выпуклой стороной. Необходимо подчеркнуть, что изменения состава и структуры молекул ПГ, характерные для ИС, наиболее выражены на вогнутой стороне кривизны позвоночника (Таблица 1). Из таблицы видно, что на вогнутой стороне общее количество ПГ (ПГ<sub>1</sub> + ПГ<sub>2</sub>) снижено по сравнению с выпуклой стороной, а относительное количество пула ПГ<sub>2</sub> более значительно. Оба пула ПГ более богаты КС. Гликозаминогликаны пула ПГ<sub>1</sub> менее сульфатированы по сравнению с ПГ<sub>1</sub> выпуклой стороны кривизны. Надо отметить, что мы не нашли достоверных различий в относительном количестве неацелированных аминсахаров на выпуклой и вогнутой стороне деформации позвоночника. Низкая степень сульфатирования ПГ<sub>1</sub> на вогнутой стороне кривизны может быть связана с относительным преобладанием ПГ, содержащих кератансульфат.

Исследование ПГ электрофорезом в геле агарозы в нейтральной среде трис-буфера позволяет разделить их по молекулярным размерам и способности образовывать межмолекулярные соединения (агрегаты) [12]. Различия структуры ПГ из пластинки роста с разных сторон деформации четко видны на электрофореграмме (Рис. 2). Если ПГ<sub>1</sub> с выпуклой стороны имеют вид одной широкой полосы, что, вероятно, указывает на их агрегированность, то ПГ<sub>1</sub> вогнутой стороны не агрегированы и разделяются на 3 отдельные фракции (Рис. 2.5,7). В этом пуле появляются ПГ с малыми размерами молекул, уходящими далеко от старта (Рис. 2.7), которые отсутствуют в ПГ<sub>1</sub> с выпуклой стороны кривизны. ПГ<sub>2</sub> с выпуклой и вогнутой стороны идут компактной полосой, т.к. они сравнимы по молекулярным размерам (Рис. 2.6,8). Следует также отметить, что во всех анализируемых ПГ, выделенных из пластинки роста больных ИС, отсутствуют высокомолекулярные фракции

(на электрофореграмме они расположены вблизи от старта (Рис. 2. 1,2)).

Экспериментально доказано, что под влиянием повышенной биомеханической нагрузки в суставном хряще синтезируются ПГ малых молекулярных размеров, одновременно повышается уровень КС [8, 14, 16]. Можно предположить, что найденные нами различия между ПГ выпуклой и вогнутой стороны могут быть связаны с повышенной биомеханической нагрузкой на вогнутой стороне деформации позвоночника, что согласуется с указанными наблюдениями. Но никто из исследователей не отмечал нарушение модификации цепей ГАГ у больных ИС. Возможно, что изменение структуры связано с нарушением генной регуляции синтеза ПГ, поскольку ИС рассматривается как генетически зависимая патология [2, 14]. Нельзя исключить, что на поздних стадиях развития ИС (IV стадия) изменения структуры ПГ усугубляются нарушением биомеханических взаимодействий в позвоночнике.

Изменения химической структуры молекул ПГ, их молекулярных размеров и агрегированности приводят к значительному нарушению архитектоники межклеточного матрикса и способствуют развитию в более ранние сроки процессов оссифи-

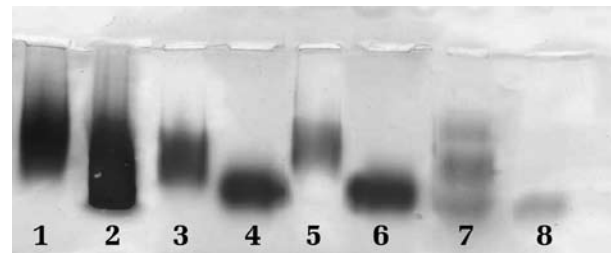


Рис. 2. Электрофорез пулов протеогликанов пластинки роста тел позвонков контрольной группы и больных идиопатическим сколиозом в геле агарозы (0,1 М трис-ацетатный буфер pH 7,3).

- 1 — ПГ<sub>1</sub> контрольная группа; 2 — ПГ<sub>2</sub> контрольная группа;
- 3 — ПГ<sub>1</sub> больных ИС; 4 — ПГ<sub>2</sub> больных ИС;
- 5 — ПГ<sub>1</sub> выпуклой стороны деформации больных ИС;
- 6 — ПГ<sub>2</sub> выпуклой стороны деформации больных ИС;
- 7 — ПГ<sub>1</sub> вогнутой стороны деформации больных ИС;
- 8 — ПГ<sub>2</sub> вогнутой стороны деформации больных ИС.

кации хряща. Как показано многими исследованиями, такие изменения ПГ предшествуют процессам замещения хряща костной тканью [6, 10, 13]. Это же подтверждают морфологические исследования, которые показывают, что у больных ИС в ПР процесс остеогенеза начинается в более раннем возрасте, до достижения скелетом зрелости [2, 13]. Эти процессы выражены на вогнутой стороне деформации, что приводит к асимметрии роста и способствует развитию сколиотической деформации.

#### Выводы

Таким образом, нами обнаружены следующие особенности ПГ пластинки роста тел позвонков больных ИС: 1 — основная часть ПГ не экстрагируется из ткани в диссоциирующих условиях (в отличие от контрольных образцов), а выделяется только после гидролиза ткани папаином, что свидетельствует об изменении взаимодействия ПГ с белками межклеточного матрикса; 2 — основную часть суммарных ПГ составляют кератансульфат-ПГ (т.е. биосинтез сдвинут в сторону увеличения количества КС-ПГ и уменьшения ХС-ПГ); 3 — углеводные цепи ПГ мало модифицированы, что может быть связано со снижением активности сульфотрансфераз и ацетилаз; 4 — снижается агрегированность и молекулярные размеры ПГ; 5 — указанные выше особенности ПГ у больных ИС наиболее выражены на вогнутой стороне кривизны позвоночника.

#### COMPOSITION OF PROTEOGLYCANS IN GROWTH PLATE OF VERTEBRAL BODIES IN PATIENT WITH IDIOPATHIC SCOLIOSIS

T.V. Rusova, V.I. Rykova, A.V. Korel,  
A.M. Zaidman

Idiopathic scoliosis is manifested by lateral deformation of the spine in children during a period of active growth. The pathogenetic mechanism of scoliosis is associated with changes in molecule structure of proteoglycans (PG), one of the main extracellular matrix components of the vertebral cartilage. The purpose of the study is to investigate PG composition in vertebral growth plates in patients with idiopathic scoliosis. The following peculiarities are revealed: 1 -major part of PG is not extractable from the tissue under dissociative conditions and, in contrast to normal, can be extracted only after tissue hydrolysis with papain; 2 — basic part of PG glycosaminoglycans contains keratansulfate, which disaccharide units are poorly modified; 3 — these specified peculiarities of PG are most pronounced on a concave side of spine deformation; 4 — quantitative and qualitative changes in PG structure of vertebral growth plates are the factors causing the failure of growth processes in a concave side of spine curvature.

#### Литература

1. Гликозаминогликаны пластинки роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом. / Т.В. Русова, В.И. Рыкова, А.В. Корель, и др. // БЭБМ. — 2005. — Т. 139. — №6. — С. 738-740
2. Зайдман А.М. Идиопатический сколиоз / А.М. Зайдман. — Новосибирск, 1994. — 235 с.
3. Adams P. Qualitative changes with age of proteoglycans of human lumbar discs / Adams P., Muir H. // Ann. Rheum. Dis. — 1976. — Vol. 34. — P. 289-296.
4. Bjornsson S. Size-dependent separation of proteoglycans by electrophoresis in gels of pure agarose / S. Bjornsson // Analyt. Biochem. — 1993. — Vol. 210. — P. 292-298.
5. Brownlee S.T. On the determination of galactosaminuronic acid / S.T. Brownlee, R.W. Wheat // Anal. Biochem. — 1966. — Vol. 14. — P. 414-420.
6. Characterization of aggregating proteoglycans from the proliferative, maturing, hypertrophic and calcifying zones of the cartilaginous physis / Y. Matsui, M. Alini, C. Webber, et al. // J. Bone Joint Surg. — 1991. — Vol. 73A. — P. 1064-1074.
7. Distribution of glycosaminoglycans across the normal and the scoliotic disc / P. Ghost, G.R. Bushell, T.K. Naylor, et al. // Spine. — 1980. — Vol. 5. — P. 10-17.
8. Elevated synthetic activity in the convex side of scoliotic intervertebral discs and endplates compared with normal tissues / J. Antoniou, V. Arlet, T. Goswami et al. // Spine. — 2001. — Vol. 26. — P. 198.
9. Farndale R.W. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue / R.W. Farndale, D.J. Buttle, A.J. Barrett // BBA. — 1986. — Vol. 883. — P. 173-177.
10. Lohmander S. Proteoglycans of mineralizing rib and epiphyseal cartilage / S. Lohmander, A. Hjerpe // BBA. — 1975. — Vol. 404. — P. 93-109.
11. Lowe J.B. A genetic approach of mammalian glycan function / J.B. Lowe, J.D. Marth // Annual. Res. Biochem. — 2003. — Vol. 72. — P. 643-690.
12. Reissig J.L. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminosugars / J.L. Reissig, J.L. Strominger, L.F. Leloir // J. Biol. Chem. — 1956. — Vol. 217. — P. 959-966.
13. Roberts S. The cartilage end-plate and intervertebral disc in scoliosis: calcification and other sequelae / S. Roberts, J. Menage, S.M. Eisenstein // J. Orthop. Res. — 1993. — Vol. 11. — P. 747-750.
14. Segregation analysis of idiopathic scoliosis: demonstration of a major gene effect / T.I. Axenovich, A.M. Zaidman, I.V. Zorkoltseva // Am. J. Med. Genet. — 1996. — Vol. 86. — P. 389-394.
15. The human lumbar endplate. Evidence of changes in biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, aging, and degeneration. / J. Antoniou, N.M. Gjudsuzian, T. Heathfield, et al. // Spine. — 1996. — Vol. 21. — P. 1153-1161.
16. The influence of scoliosis and ageing on proteoglycan heterogeneity in the human intervertebral disc / J. Melrose, K.R. Gurr, T.C. Cole, et al. // J. Orthop Res. — 1991. — Vol. 9. — P. 68-77.
17. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification / S. Roberts, J. Urban, H. Evans, S.M. Einstein // Spine. — 1996. — Vol. 21. — P. 415-420.