

УДК 612.75.014.461

© Коллектив авторов

ВЛАГООБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ГИАЛИНОВОМ ХРЯЩЕ И ЕГО ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТАХ В НОРМЕ И ОСТЕОАРТРОЗЕ.

С.С.НИКОЛАЕВА¹, КИМ ЗОН ЧХОЛ¹, В.А.БЫКОВ¹, А.А.РОЩИНА¹,
Л.В.ЯКОВЛЕВА¹, О.А.КОРОЛЕВА¹, Н.П.ОМЕЛЬЯНЕНКО², Л.Б.РЕБРОВ¹

¹ Научно-исследовательский и учебно-методический центр биомедицинских технологий ВИЛАР,

123056 г. Москва, ул. Красина, д. 2, тел. 254 - 4636, факс (095) 254 - 5681

² Центральный институт Травматологии и Ортопедии РАМН,

125299 г. Москва, ул. Приорова, д. 10, тел. 450 - 4231

Дана сравнительная количественная оценка содержания различных форм воды в гиалиновом хряще и в его структурных компонентах: коллагене, гиалуронате калия, хондроитин сульфате натрия и в их комплексных соединениях в норме и патологии. Установлено наличие в компонентах хрящевого матрикса нескольких фракций связанной воды, различающихся по степени связывания. При максимальной относительной влажности в коллагене практически вся вода связана с активными группами биополимеров, а в гликозаминогликанах (ГАГ) помимо связанной воды, обнаружено по крайней мере, две кристаллические формы замораживаемой, т.е. свободной воды.

Содержание свободной воды пропорционально количеству хондроитинсульфата натрия (ХИН) в коллагеновых пленках. Фракция свободной воды в комплексах коллаген - гиалуронат калия (ГУК) регистрируется только при низкой концентрации гиалуроната калия.

В гиалиновом хряще в отличие от других соединительных тканей (кожа, ахиллово сухожилие) большая часть воды находится в свободном состоянии, количество которой увеличивается при остеоартрозе.

Высказано предположение, что перераспределение фракций связанной и свободной воды в пользу последней при остеоартрозе является результатом, возникающего дефицита гиалуроновой кислоты, что необходимо учитывать при разработке методов лечения остеоартроза.

Ключевые слова: хрящ, остеоартроз, коллаген, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, влагообмен.

ВВЕДЕНИЕ. Химический состав хрящевой ткани и ее физико-химические свойства практически полностью определяются ее матриксом.

Основная масса матрикса гиалинового хряща состоит из волокон коллагена II типа, погруженных в гель протеогликанов и воды, в которой растворены органические и неорганические соли [1].

Содержание воды в хряще столь велико (>70%), что принято говорить о гипергидратированном состоянии матрикса, которое определяет многие физико-химические и биомеханические свойства хряща. Белково-полисахаридные агрегаты способны формировать сложные сетевидные переплетения, которые удерживают в своих ячейках воду и растворы электролитов. При патологии хряща происходит изменение структуры коллагена и убыль протеогликанов, что приводит к изменению гидратации хрящевой ткани и ухудшению ее устойчивости к механическим нагрузкам [2 - 5].

Подвижность тканевой воды и ее способность растворять соли и другие водорастворимые компоненты определяются прочностью ее связи с биополимерами ткани и влияют на осмотические и компрессионные процессы в хряще. В связи с этим является важным знание не только количественных характеристик влагосодержания хряща, но и природы содержащейся в нем воды. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению биохимического состава и физико-химических свойств хряща этот вопрос остается недостаточно изученным.

Целью данной работы явилось изучение состояния воды в хряще и его основных компонентах в норме и патологии.

МЕТОДИКА. Объектом исследования служили образцы хряща надколенника, бедра, мышечка, полученные на аутопсиях в пределах 24 ч у лиц в 21-23 лет, погибших в результате травмы, а также хрящ головки бедра, удаленный во время оперативного вмешательства по поводу остеоартроза.

В качестве объекта исследования белкового компонента матрикса хряща использовались препараты водорастворимого коллагена, в качестве гликозаминогликанов (ГАГ) применяли натриевую соль хондроитинсульфата (ХИН) и калиевую соль гиалуроновой кислоты (ГУК), приобретенные у (Serva, Германия).

При исследовании способности хрящевого матрикса связывать и удерживать воду использованы модельные системы, состоящие из ГАГ и коллагена, которые по ряду физико-химических свойств близки к соединительной ткани [6,7]. Для этого приготавливались пленки, состоящие из коллагена и ГАГ в различных концентрационных соотношениях.

Для изучения особенностей гидратации основных компонентов матрикса хрящевой ткани была применена разработанная в НИЦ БМТ методология, включающая комплекс акваметрических методов: дифференциально-сканирующую калориметрию, изучение процессов сорбции-десорбции водяных паров, титрование с реактивом Фишера [8].

При изучении процессов сорбции водяных паров использовали сорбционно-десорбционный метод, заключающийся в определении количества сорбированной и десорбированной воды исследуемыми образцами при различных значениях упругости водяных паров. Влажностный режим в диапазоне $P/P_s = 0,07 - 0,98$ создавался в специальных эксикаторах, на дне которых

находились насыщенные растворы эталонных солей. Величину относительной влажности контролировали с помощью прибора "Волна-1". Исследование равновесной сорбции паров воды, достигаемое образцами за 24 часа, позволило определить величину максимальной сорбции (a_{\max}) при различных значениях P/P_s . Количество мономолекулярно сорбированной воды или величину "эффективной емкости монослоя" (a_m) рассчитывали по данным изотермы сорбции, используя уравнение Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ) [9].

Для изучения содержащейся в образцах воды и прочности ее связывания проводили калориметрические исследования на дифференциальном сканирующем калориметре DSC-2 (Perkin-Elmer). Исследуемые образцы (5 - 7 мг) с различной степенью увлажнения помещали в стандартные алюминиевые кюветы и запечатывали их для предотвращения высыхания. Термограммы получали в температурном диапазоне от - 30°C до 300°C при скорости нагревания 10 град/мин теплоту фазового перехода ΔH рассчитывали по формуле:

$$\Delta H = \frac{A \cdot K \cdot R}{W \cdot S}, \text{ кал/г или Дж/г, где}$$

A - площадь пика, см²; K - константа прибора; R - чувствительность прибора, мкал/с; S - скорость ленты самописца мм/мин; W - масса образца, г.

При расчете количества вымораживаемой (свободной) воды использовали величину теплоты плавления льда $\Delta H = 79,4$ кал на 1 г H₂O. Общее содержание воды определяли по методу Фишера [10]. Количество связанной воды рассчитывали по разности между общим влагосодержанием и количеством свободной воды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты исследования содержания воды в различных типах гиалинового хряща в норме и патологии, представленные в табл. 1, свидетельствуют, что в хряще бедра обнаружено большое содержание воды, которое увеличивается в процессе возникновения остеоартроза.

Таблица 1. Влагосодержание хрящевой ткани.

Наименование образца	Содержание воды, г/100 г ткани				
	общая	связанная	свободная	a_m	a_{\max}
Надколенник	72,91±0,4	21,87±0,4	51,03±0,7	9,22±0,05	40,29±0,44
Мышечок	71,23±0,6	14,96±0,3	56,27±0,8	10,45±0,28	42,9±0,42
Бедро (норма)	70,51±0,5	15,42±0,2	55,09±0,5	6,28±0,48	37,85±1,68
Бедро (остеоартроз)	80,91±0,5*	1,77±0,1*	79,14±0,4*	8,96±0,04*	47,09±0,50*

Примечание: * - Достоверно по сравнению с нормой при $P \leq 0,05$. Представлены данные 5 экспериментов.

Для того, чтобы оценить характер содержащейся в хряще воды и количественное соотношение ее фракций проводились калориметрические и сорбционные исследования образцов хряща. На ДСК термограммах всех изученных образцов хряща в температурной области ниже 0° С регистрируется фазовый переход, обусловленный плавлением замороженной, то есть свободной воды, количество которой представлено в табл. 1. Из этих данных следует, что

содержание свободной воды в гиалиновом хряще в ~2 раза превосходит количество связанной. В процессе развития остеоартроза количество свободной воды увеличивается в 1,5 раза, а связанной воды уменьшается в 10 раз.

Термограммы этих же образцов гиалинового хряща в температурной области выше 20° С (рис. 1) характеризуются двумя эндотермическими переходами. Первый из них регистрируется в широком температурном интервале (40° С - 180° С) трехгорбым пиком с T_{\max} 94, 100, 113° С, что свидетельствуют об энергетической неоднородности связанной воды, обусловленной наличием в биополимерах хряща различных типов активных центров на их поверхности, с которыми взаимодействуют молекулы воды. Поскольку этот фазовый переход исчезает при высушивании хряща над P_2O_5 и вновь восстанавливается после регидратации, его можно отнести к фазовому переходу, обусловленному испарением воды в этом температурном интервале. На термограмме остеоартрозного хряща, в отличие от нормы, в тех же температурных интервалах регистрируются более выраженные энтальпийные фазовые переходы. Следует обратить внимание на то, что даже после длительного высушивания в вакууме над P_2O_5 в хряще остается 2 - 2,5 % воды, которая как было показано на образцах коллагена и кожи, является структурно связанной с биополимерами ткани и удаляется только в процессе ее разрушения при высокой температуре [11]. Второй эндотермический фазовый переход происходит при 224° С. По литературным данным он относится к плавлению кристаллических структур одного из главных компонентов соединительной ткани - коллагена [10]. На термограмме остеоартрозного хряща фазовый переход, обусловленный плавлением коллагена отсутствует. Очевидно, наблюдаемые изменения фазовых переходов хрящевой ткани обусловлены изменениями вторичной и четвертичной структуры коллагена и ГАГ, вызванными артрозом. Выявленные особенности термографических характеристик остеоартрозного хряща могут быть использованы в качестве теста на изменение структуры биополимеров хряща и их способности связывать воду при патологии.

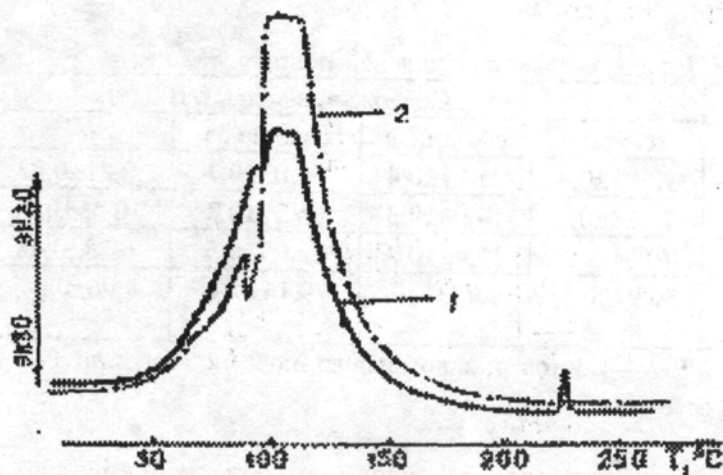


Рисунок 1.

ДСК - термограмма хряща бедра человека: 1- норма, 2- остеоартроз.

Для того, чтобы установить количество воды, находящейся в непосредственном контакте с активными группами хряща, исследовали процессы сорбции - десорбции различных типов гиалинового хряща (рис. 2 А). Изотермы сорбции-десорбции имеют S - образную форму, характеризуются гистерезисом,

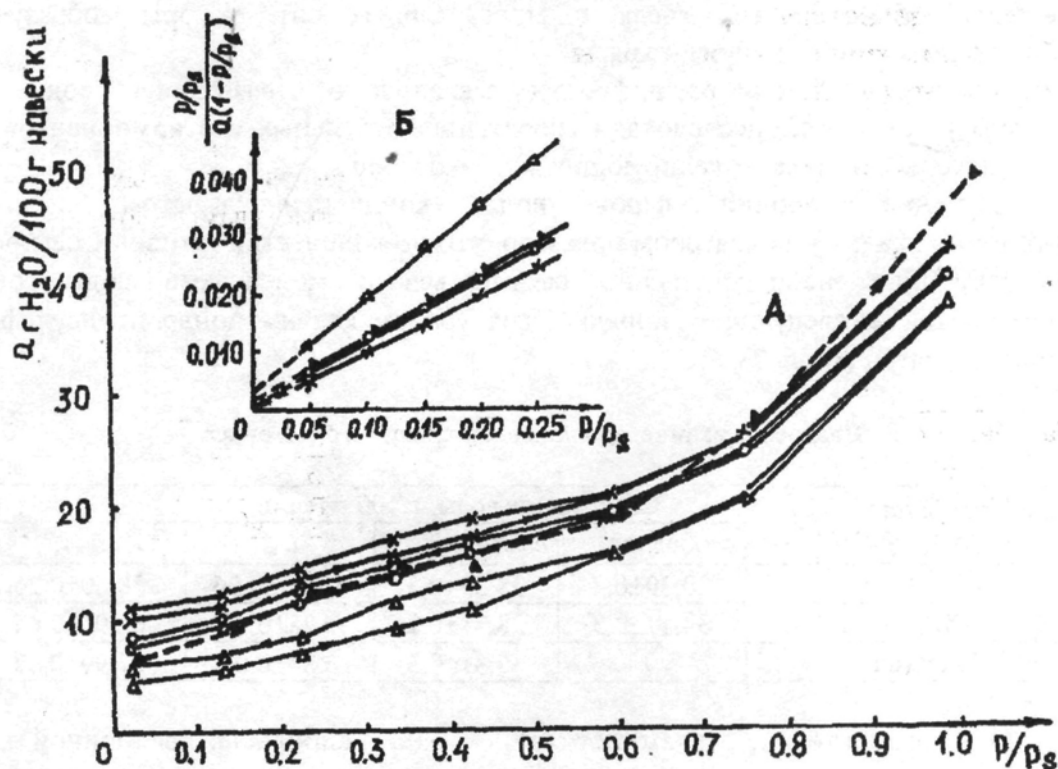


Рисунок 2 А, Б.

Изотермы сорбции (\rightarrow), десорбции (\leftarrow) паров воды хряща человека: в координатах

$$a - P/P_s \text{ (А) и } \frac{P/P_s}{a(1-P/P_s)} - P/P_s \text{ (Б)}$$

о - надколенник; х - мыщелок; бедро: Δ - норма, \blacktriangle - остеоартроз

свидетельствуют о многообразии форм и по классификации Брунауэра являются изотермами 2-ого типа. Первый участок $P/P_s = 0 - 0,25$ характеризуется интенсивной сорбцией влаги функциональными группами биополимеров хрящевой ткани. Изотермы сорбции паров воды хрящом на этом участке могут быть описаны уравнением БЭТ, в координатах которого они имеют линейный участок (рис. 2, Б). Их анализ позволяет определить величины эффективной емкости монослоя a_m и максимальной сорбции a_{max} . Результаты исследования содержания общей, связанной и свободной воды, а также величины эффективной емкости монослоя a_m и сорбционной способности хряща представлены в таблице 1. По количеству воды, находящейся в непосредственном контакте с активными группами биополимеров хряща, и по сорбционной способности при $P/P_s = 0,98$ изученные образцы хряща располагаются в следующем порядке: мыщелок > надколенник > бедро. Сравнение величины a_m хряща бедра в норме и при патологии показали, что количество активных центров, способных

связываться с молекулами воды, а также сорбционная емкость хряща при $P/P_s = 0,98$ повышаются в процессе остеоартроза. Таким образом, несмотря на снижение ГАГ, которое, по литературным данным, происходит в процессе остеоартроза хряща, последний обладает большей влагопоглощающей способностью. Такое явление может быть обусловлено структурными изменениями осмотических ячеек и молекулярных сит, которые образуют ГАГ и коллаген при патологии хряща.

Для дальнейшей расшифровки механизмов связывания воды с биополимерами хряща, исследовали гидратацию отдельных его компонентов и их комплексных систем, моделирующих матрикс хряща.

Изучение сорбции паров воды хондроитинсульфатом натрия, гиалуронатом калия и коллагеном показало, что по количеству активных центров (a_m), способных непосредственно связываться с молекулами воды, они располагаются в следующем порядке: гиалуронат калия > хондроитинсульфат натрия > коллаген (табл. 2).

Таблица 2. Влагосодержание компонентов хрящевого матрикса.

Наименование образца	Содержание воды, г/100 г ткани			
	свободная	связанная	a_m	a_{max}
ГУК	$20,30 \pm 0,2$	$38,30 \pm 0,3$	$13,83 \pm 0,06$	$58,60 \pm 0,26$
ХИН	$34,17 \pm 0,3$	$28,78 \pm 0,2$	$9,28 \pm 0,49$	$62,95 \pm 0,64$
Коллаген	0	$35,31 \pm 0,3$	$6,84 \pm 0,07$	$37,99 \pm 0,57$

При относительной влажности $P/P_s = 0,98$ наибольшей величиной a_{max} обладает хондроитин - сульфат натрия, который в этих условиях поглощает в $\sim 1,7$ раза больше воды по сравнению с коллагеном.

Для того, чтобы оценить природу воды, поглощаемой препаратами ГАГ и коллагена в условиях различной влажности, были проведены калориметрические исследования образцов в температурном интервале $-30 \div 300^\circ \text{C}$ и подсчитано содержание фракций свободной и связанной воды (табл. 2).

На рис. 3 приведены термограммы образцов ГАГ и коллагена в температурной области ($0 \div -30^\circ \text{C}$), выдержанных при $P/P_s = 0,98$ до равновесного влагосодержания. Как видно из приведенных данных, на термограмме хондроитинсульфата натрия и гиалуроната калия регистрируются энтальпийные пики, обусловленные плавлением замораживаемой, то есть свободной воды. Следует обратить внимание, что вода, содержащаяся в образцах ГАГ, отличается от обычной тем, что она плавится значительно ниже 0°C , а энтальпийный пик плавления в отличие от плавления льда регистрируется в широком температурном интервале ($-10^\circ \text{C} \div -15^\circ \text{C}$) двумя пиками. Это свидетельствует о наличии в ГАГ по крайней мере двух кристаллических форм замораживаемой воды, что, очевидно, обусловлено существованием нескольких фракций свободной воды, различающихся по термодинамическим свойствам.

Значения величин фракций свободной и связанной воды, рассчитанные по данным термограмм максимально увлажненных образцов, показали, что в отличие от хондроитин - сульфата натрия большая часть воды, сорбированная гиалуронатом калия находится в связанном состоянии. При этом в коллагене в

этих влажностных условиях вся вода связана с активными группами биополимеров (табл. 2).

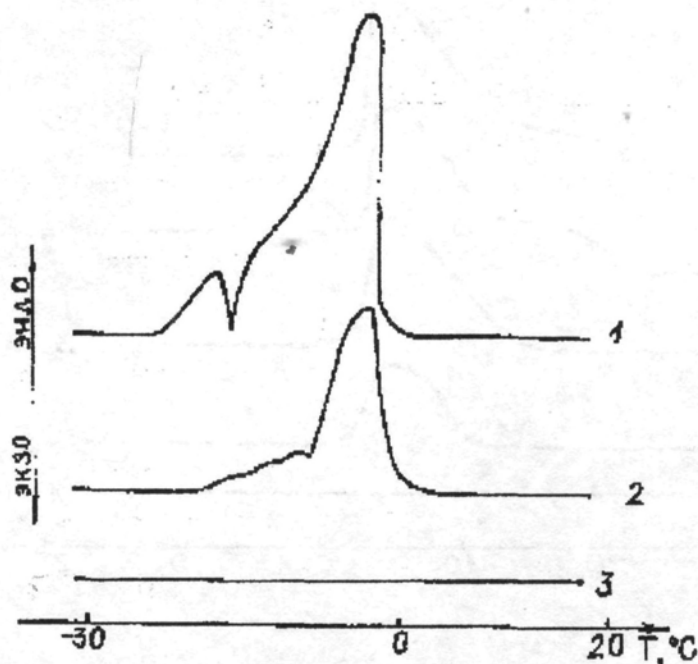


Рисунок 3.

Фазовые переходы вымораживаемой (свободной) воды в компонентах хрящевого матрикса при $P/P_s = 0,98$: 1 – хондроитинсульфат натрия; 2 – гиалуронат калия; 3 – коллаген.

Термограмма этих же образцов в температурной области 30-300 С характеризуется двумя фазовыми переходами. Поскольку этот фазовый переход исчезает в результате высушивания и вновь возникает при регидратации так же, как и в случае хряща его можно отнести к фазовому переходу, обусловленному испарением воды. Следует обратить внимание, что величина энтальпии при удалении воды из ГАГ в 7 - 8 раз превышает таковую же из коллагена (табл. 3).

Таблица 3. Температурные интервалы и величины энтальпий фазовых переходов компонентов хрящевого матрикса.

Образец при $P/P_s=0,6$	пик 1		пик 2	
	$T_{max}, ^\circ C$	$\Delta H \text{ Дж/г}$	$T_{max}, ^\circ C$	$\Delta H \text{ Дж/г}$
Коллаген	$75 \pm 1,0$	$36 \pm 4,5$	$178 \pm 3,0$	$54 \pm 5,0$
ХИН	$95 \pm 1,0$	$294 \pm 15,0$	$257 \pm 5,0$	$163 \pm 7,0$
ГУК	$107 \pm 2,0$	$261 \pm 12,0$	$250 \pm 2,0$	$164 \pm 7,0$

Кроме того, удаление воды из хряща и ГАГ происходит в более широком температурном интервале и заканчивается при температуре на 20-30° С выше, чем из коллагена, что свидетельствует о более разнообразной форме и более прочной связи сорбируемой воды с активными группами биополимеров хряща и ГАГ по сравнению с коллагеном.

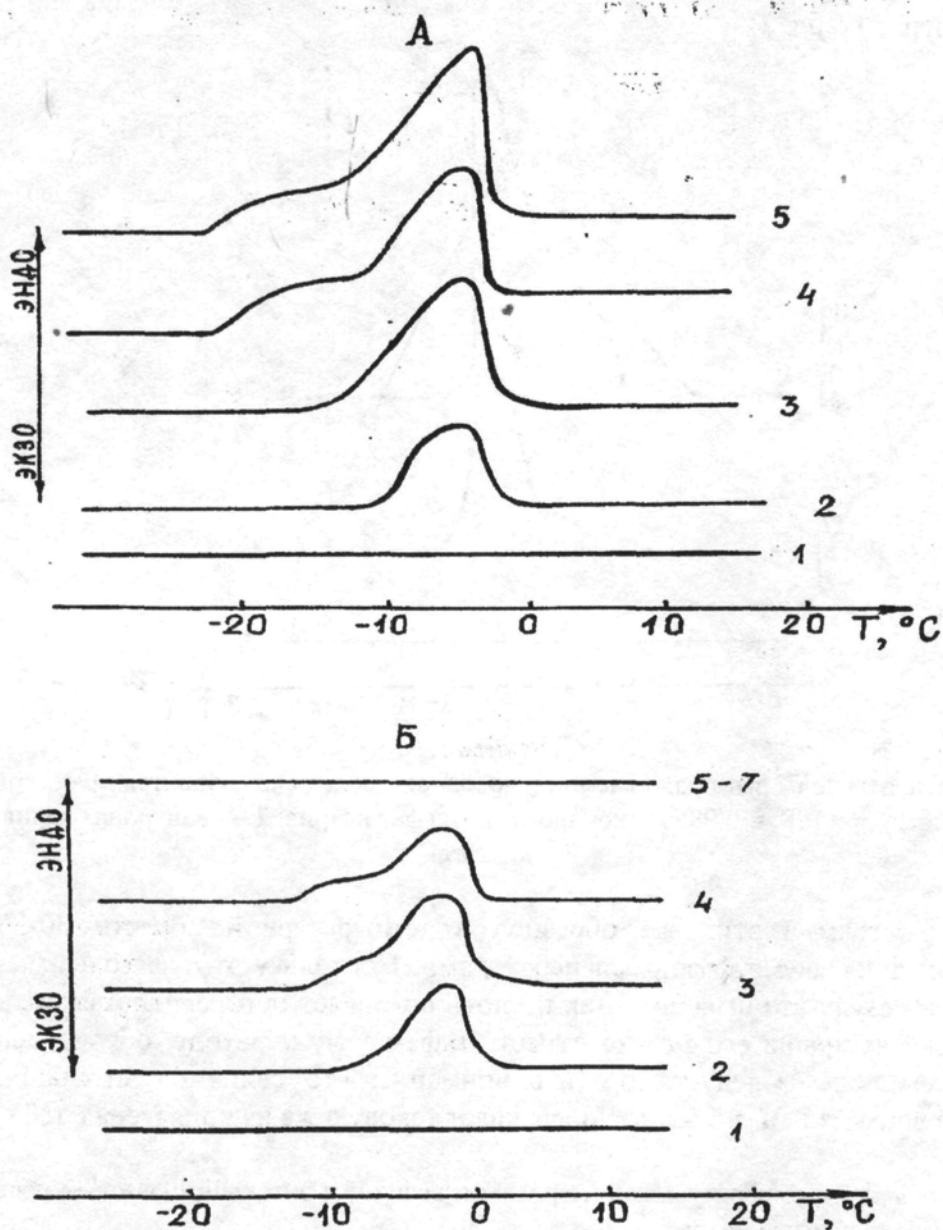


Рисунок 4 А, Б.

Фазовые переходы вымораживаемой (свободной) воды в пленках: (А) соотношение коллаген мг/мл : ХИН (мг/мл). 1 - 1,0 : 0; 2 - 1,0 : 0,05; 3 - 1,0 : 0,1; 4 - 1,0 : 0,2; 5 - 1,0 : 0,3. (Б) соотношение коллаген мг/мл : ГУК (мкг/мл). 1 - 1,0 : 0; 2 - 1,0 : 0,5; 3 - 1,0 : 1,0; 4 - 1,0 : 2,0; 5 - 1,0 : 3,0; 6 - 1,0 : 4,0; 7 - 1,0 : 6,0.

Калориметрические и сорбционные исследования особенности состояния воды в модельных системах матрикса хряща, содержащих коллаген и ГАГ, увлажненных при $P/P_s = 0,98$ показали, чем больше в пленках ХИН, тем больше площадь эндотермы плавления замороженной воды и соответственно количество фракции свободной воды (рис. 4, А). При соотношении коллаген : ХИН - 1 : 0,3 мг/мл содержание свободной воды увеличивается в 8 раз по сравнению с однокомпонентной пленкой коллагена. Сорбционная способность (a_{\max}) этих пленок так же растёт.

Несколько иная картина изменения состояния воды в коллагеновых пленках наблюдается при введении в них ГУК (рис. 4Б). Площадь эндотермы плавления замораживаемой воды в комплексных пленках сначала увеличивается и достигает максимума при соотношении коллаген: ГУК-1,0 (мг/мл): 2,0 (мкг/мл). В этом случае содержание свободной воды в пленке возрастает в ~2,8 раза и соответственно растет сорбционная способность пленок. Дальнейшее увеличение содержания ГУК в коллагеновой пленке приводит к исчезновению фазового перехода лед - вода. При этом сорбционная способность (a_{\max}) не меняется. Таким образом, вся вода, имеющаяся в двухкомпонентной системе белок - ГУК, переходит в связанное состояние.

Можно предположить, что одной из причин обнаруженного в остеоартрическом хряще перераспределения фракций связанной и свободной воды в пользу последней, происходит за счет установленного дефицита гиалуроновой кислоты возникающего при патологии, что необходимо учитывать при разработке методов лечения остеоартроза [11].

Разработанная методология исследования процессов гидратации позволила оценить с высокой точностью закономерности влагообмена хрящевой ткани и установить характер его изменения при патологии.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Ake O., Antonsson P., Hedbom E., Heinegard D. (1990) Biochem. Soc. Trans., **18**, 789-792.
2. Bassar P. J., Schneiderman R., Bank R. A., Wachtel E., Maroudas A. (1998) Arch. Biochem. Biophys., **351**, 207-219.
3. Maroudas A., Wachtel E., Grushko G., Katz E.P., Weinberg B.. (1991) Biochim. Biophys. Acta, **1073**, 285-295.
4. Maroudas A., Venn M. (1977) Ann. Rheum. Dis., **36**, 399-406.
5. Дубинская В.А., Николаева С.С., Хорошков Ю.А., Королева О.А. (1991), Бюлл. exper. биол. и мед., №3, 267-269.
6. Mathews B. Martin, Decker Laverne. (1977) Biochim. Biophys. Acta, **497**, 151-159.
7. Бычков С.М., Николаева С.С., Харламова В.Н. (1971) Бюлл. exper. биол. мед., №11, 38-40.
8. Вязникова М.Ю., Николаева С.С., Быков В.А., Ребров Л.Б., Королева О.А. (1998) Биомед. технологии, **10**, 78-80.
9. Грег С., Синг К. (1970) Адсорбция, удельная поверхность, пористость, М., Мир,
10. Климова В.А. (1975) Основные микрометоды анализа органических соединений, М., Мир.
11. Михайлов А.Н. (1980) Химия и физика коллагена кожного покрова, М, Легкая индустрия.

Поступила 10.11.2000 г.

WATER - EXCHANGE PROCESSES IN HYALINE CARTILAGE AND IN ITS MAJOR COMPONENTS IN NORMAL AND OSTEOARTHRISIS CARTILAGE.

S.S. Nikolaeva¹, Kim Zong Chhol¹, V.A. Bykov¹, A.A. Roshina¹, L.B. Yakovleva¹,
O.A. Korolyova¹, N.P. Omelianenko², L.B. Rebrov¹

¹Scientific Research and school-methodical Center for Biomedical Technology,
123056 Moscow, Krasina str. 2, fax (095) 254 - 5681

²Central Institute of Traumatology and Orthopedics RAMS 125299 Moscow, Priorova str. 10,
tel. 450 - 4231

The content of different forms of tissue water was studied in the normal articular cartilage and osteoarthritis cartilage and its structural components: collagen, potassium hyaluronate, sodium chondroitinsulphate and its complexes.

In the components of cartilage matrix a few of fractions of bound water different in the strength of binding are present. At the maximal humidity, all water in collagen binds with the active groups of biopolymers and in the glycosaminoglycans, in addition to bound water, are present, two crystal forms of freezing water (free water) at least.

The quantity of free water in the collagen - chondroitin sulphate membrane, is increased with the increase of chondroitin sulphate. In the collagen - hyaluronate complex, fraction of free water is found only at the low concentration of hyaluronate kalium.

It was shown that in the hyalin cartilage, in different from the other connective tissue (skin, achilles tendon), the most part of water is free water and its quantity is increased in the osteoarthritis.

It is supposed that the rearrangement of binding and free-water fractions in the osteoarthritis is the result of deficiency of hyaluronic acid and therefore this may be regarded in the improvement of methods of treatment.

This scientific and methodical approach allow to receive information on the forms and binding energy of water in the biological tissues, which is absorbed from fluids and steam phase and determine characters of the pathological changes.

Key words: cartilage, osteoarthritis collagen, hyaluronic acid, chondroitin sulphate, water - exchange