

УДК 612.75.014.461

©Коллектив авторов

## ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОЛЛАГЕНА И СОСТОЯНИЯ ВОДЫ ХРЯЩА ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ.

КИМ ЗОН ЧХОЛ, В.А. БЫКОВ, С.С. НИКОЛАЕВА, Г.А. РЕБРОВА,  
А.А. РОЩИНА, Н.В. РУМЯНЦЕВА, Л.В. ЯКОВЛЕВА, О.А. КОРОЛЕВА,  
Л.Б. РЕБРОВ

Научно-исследовательский и учебно-методический  
Центр биомедицинских технологий ВИЛАР

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

Изучено изменение структурной стабильности коллагена и влагоемкости суставного хряща человека в норме и при остеоартрозе (ОА) до и после экстрагирования гликозаминогликанов (ГАГ) 4 М раствором гуанидинхлорида. Для изучения количества и характера воды в хряще были использованы: термический анализ, титрование с реактивом Фишера и изучение процессов сорбции-десорбции паров воды. Степень стабильности коллагена определяли по устойчивости к гидролитической деструкции протеазами: коллагеназой, проназой и пепсином. Показано, что ослабление связей между основными компонентами матрикса хряща и уменьшение количества ГАГ в хряще при остеоартрозе, сопровождается структурной дезорганизацией коллагеновых молекул, которая проявляется в нарушении внутримолекулярных связей в телопептидах и межмолекулярных связей в спирализованных участках коллагеновых молекул. Эти изменения могут вносить свой вклад в увеличение общего влагосодержания при ОА. При этом отношение фракций воды свободная : связанная увеличивается от 5 в норме до 44 при ОА. Полученные данные могут быть использованы в качестве критериев оценки патологии суставного хряща человека.

**Ключевые слова:** хрящ, остеоартроз, коллаген, гексозамины, уроновые кислоты, влагообмен.

**ВВЕДЕНИЕ.** Остеоартроз (ОА) является одной из распространенных форм суставной патологии [1-3]. Наиболее характерными биохимическими изменениями хрящевой ткани при ОА являются: потеря протеогликанов (ПГ), нарушение их агрегации и укорочение цепей гликозаминогликанов (ГАГ) [4, 5].

Содержание коллагена при ОА существенно не меняется. Однако изменяются его качественные характеристики за счет возникновения структурных

аномалий коллагена. Наряду с коллагеном  $[\alpha_1(\text{II})]_3$  типа, характерным для нормального хряща, появляются другие коллагены и, в частности, коллаген  $[\alpha_1(\text{I})_2-(\alpha_2)_1]$  типа, который обладает меньшей степенью гликозилирования, что может способствовать возникновению функциональных дефектов суставного хряща [6-8].

До сих пор не удалось объяснить, почему обеднение матрикса суставного хряща наиболее гидрофильными компонентами, такими, как ГАГ и протеогликаны, сопровождается увеличением содержания воды в матриксе хряща при ОА [9].

Изучению влагообменных процессов в хрящевой ткани посвящено большое количество работ [10-12]. Однако, до сих пор нет единого мнения о характере содержащейся воды и прочности ее связи с биополимерами матрикса хряща.

Высказывается предположение, что одной из причин повышения влагосодержания хряща при ОА является изменение структуры содержащегося в нем коллагена [9]. Однако, до сих пор эта гипотеза не получила своего подтверждения.

Целью данной работы является изучение влияния ОА на структурную устойчивость коллагена и состояние воды в суставном хряще человека.

**МЕТОДИКА.** Объектом исследования служили образцы суставного хряща людей (возраст 21-23 года), полученные на аутопсиях в пределах 24 ч у лиц, погибших в результате травмы и удаленные во время оперативного вмешательства (возраст 45-55 лет) по поводу ОА.

Для удаления гликозаминогликанов измельченный хрящ головки бедра обрабатывали 4 М гуанидинхлоридом в 0,05 М трис-буфере pH 7,5 с добавлением ингибитора протеолитических ферментов (0,1 М  $\epsilon$ -амино-капроновая кислота, 0,005 М – бензамидин гидрохлорид, 10 мМ ЭДТА) при постоянном перемешивании при 4 °С в течение 48 часов [13]. Ферментный протеолиз коллагена проводили препаратами фирмы «Serva»: бактериальной коллагеназой (КФ 3.4.24.3), проназой и пепсином (КФ 3.4.23.1). Условия ферментного протеолиза: отношение фермент/субстрат 1/10, температура 37°С продолжительность 24 ч, буфер 0,2 М трис-HCl pH 7,6, содержащий 0,014 М  $\text{CaCl}_2$  для коллагеназы и проназы, а для пепсина - 3 % М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

Контролем служила проба, не содержащая фермент. После окончания протеолиза нерастворимый белок удаляли из инкубационной смеси фильтрованием и определяли содержание оксипролина [14].

За 100 % было принято количество оксипролина в нативных препаратах хряща после их полного кислотного гидролиза смесью концентрированных кислот HCl:CHOOH в соотношении 2:1 на водяной бане в течение 9 час. В исследуемых тканях определяли содержание гексозаминов [15] и уоновых кислот [16]. Продукты гидролиза характеризовали методом гель-фильтрации на колонке с Tooupearl-HW 55 [17].

Для изучения особенностей гидратации хрящевой ткани была применена разработанная ранее методология, включающая комплекс акваметрических методов (титрование с реактивом Фишера, термический анализ, сорбционный метод исследования) [18]. Результаты исследования обрабатывали статистически с использованием t критерия Стьюдента [19].



**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** В табл. 1 приведены данные содержания биохимических компонентов в матриксе хряща в норме и ОА.

Таблица 1. Содержание основных биохимических компонентов в суставном хряще в норме и при ОА  $X \pm m$ .

Образец хряща	Содержание, г/100 г сухой ткани		
	коллаген	гексозамины	уроновые к-ты
Норма (контроль)	53,40 $\pm$ 1,86	5,05 $\pm$ 0,28	4,23 $\pm$ 0,45
Норма (обработан гуанидинхлоридом)	68,37* $\pm$ 1,21	2,23* $\pm$ 0,29	2,73* $\pm$ 0,13
Остеоартроз (контроль)	54,10 $\pm$ 1,77	3,40 $\pm$ 0,56	3,47 $\pm$ 0,26
Остеоартроз (обработан гуанидинхлоридом)	76,30* $\pm$ 1,32	0,93* $\pm$ 0,03	2,07* $\pm$ 0,12

Примечание: \*- различие достоверно по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$ .

Из полученных данных следует, что содержание коллагена в процессе ОА хряща практически не меняется. Однако, количество ГАГ снижается. Об этом свидетельствует уменьшение в 1,5 и 1,2 раза соответственно количеств гексозаминов и уроновых кислот в хряще при ОА.

Изменение прочности связи между коллагеном и ГАГ в процессе ОА оценивалось по количеству гексозаминов и уроновых кислот, остающихся в хрящевой ткани после обработки 4 М гуанидинхлоридом.

Из приведенных данных следует, что в результате обработки гуанидинхлоридом, из нормального хряща удаляются ~56 % гексозаминов и ~36% уроновых кислот, а из ОА хряща ~73 % и ~40 % соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в результате ОА связь между коллагеном и протеогликанами ослабляется, что подтверждают литературные данные [20].

Увеличение содержания коллагена в хряще после обработки гуанидинхлоридом объясняется удалением значительного количества ГАГ из образцов ткани.

Для оценки влияния роли ГАГ во влагообменных процессах были проведены сравнительные исследования количества и характера воды, содержащейся в нормальном хряще, после удаления из него ГАГ и в ОА хряще.

Из данных, приведенных на рис. 1, следует, что при ОА в хряще происходит повышение общего влагосодержания, которое сопровождается изменением природы связанной воды. Об этом свидетельствует увеличение фракции свободной и уменьшение фракции связанной воды. Отношение фракций воды свободная : связанная в хряще увеличивается от 5 в норме до 44 при ОА, что свидетельствует о том, что практически вся вода, содержащаяся в хряще при ОА, в отличие от нормы находится в свободном состоянии. Аналогичная тенденция повышения общего влагосодержания и перераспределение фракций воды в пользу свободной наблюдается и при обработке хряща гуанидинхлоридом. Однако, количественно эти изменения менее значимы. Такие данные позволяют сделать вывод о том, что характер воды и прочность ее связи с биополимерами определяется не только гликозаминогликанами, которые являются наиболее гидрофильными, но и другими компонентами хряща. Поскольку многие свойства биологических тканей зависят от локализации воды, которая в свою очередь определяется первичной структурой биополимеров и их конформацией,

предстояло выяснить, как меняется структура коллагеновой молекулы в процессе остеоартроза [21].

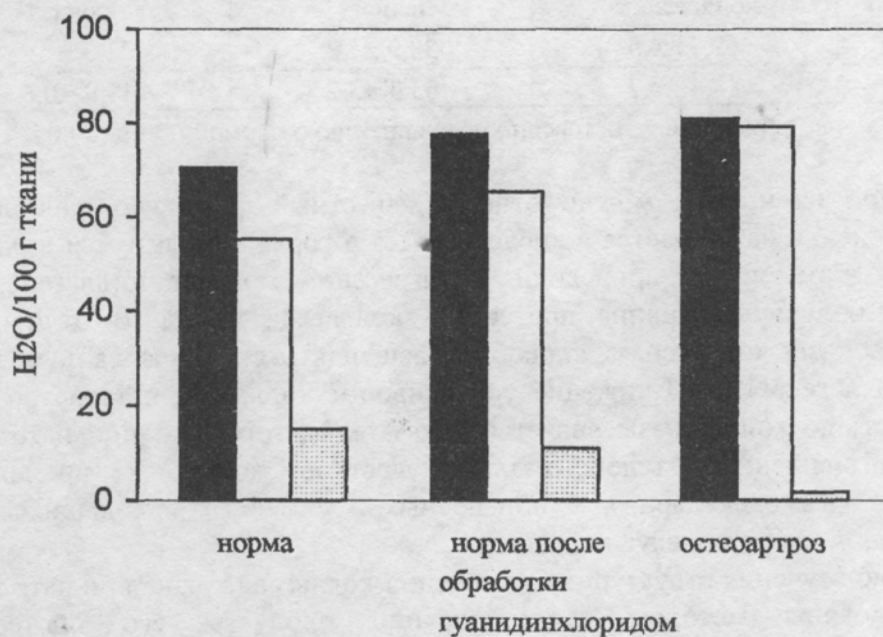


Рисунок 1.

Содержание различных фракций воды в суставном хряще.

■ общая □ свободная ▨ связанная

Известно, что тип и локализация поперечных связей, а так же присутствие связанных протеогликанов являются основными факторами, определяющими чувствительность коллагена к ферментному гидролизу [22]. С этой целью была проведена сравнительная оценка степени гидролитической деструкции коллагена хрящевой ткани в норме и при ОА.

В табл. 2 приведены результаты этих исследований. Из представленных данных следует, что устойчивость коллагена патологического хряща к протеолизу по сравнению с нормой снижается.

Таким образом, уменьшение протеолитической резистентности коллагена хряща к действию пепсина и проназы свидетельствует о том, что, несмотря на то, что количество коллагена в хряще практически не снижается, происходят его структурные изменения, связанные с нарушением внутри- и межмолекулярных поперечных связей в молекуле коллагена.

Известно, что пепсин и проназа отщепляют телопептиды, разрушая тем самым внутримолекулярные поперечные связи. Чем больше ослаблены эти концевые участки трехцепочечной молекулы коллагена, тем более уязвима она к действию этих ферментов [23]. Из данных табл. 2 так же следует, что пепсин сильнее расщепляет коллаген, чем проназа, что можно объяснить, несколькими причинами.



Таблица 2. Протеолиз хрящевой ткани человека после удаления ГАГ.

Хрящ	Содержание оксипролина в растворе, %		
	коллагеназа	пепсин	проназа
Норма	69,3 ±4,5	38,9 ±5,2	21,3 ±1,9
ОА	88,4*±3,2	63,3*±3,2	33,9*±0,6

Примечание: \*- различие достоверно по сравнению с нормой при  $p \leq 0,05$ .

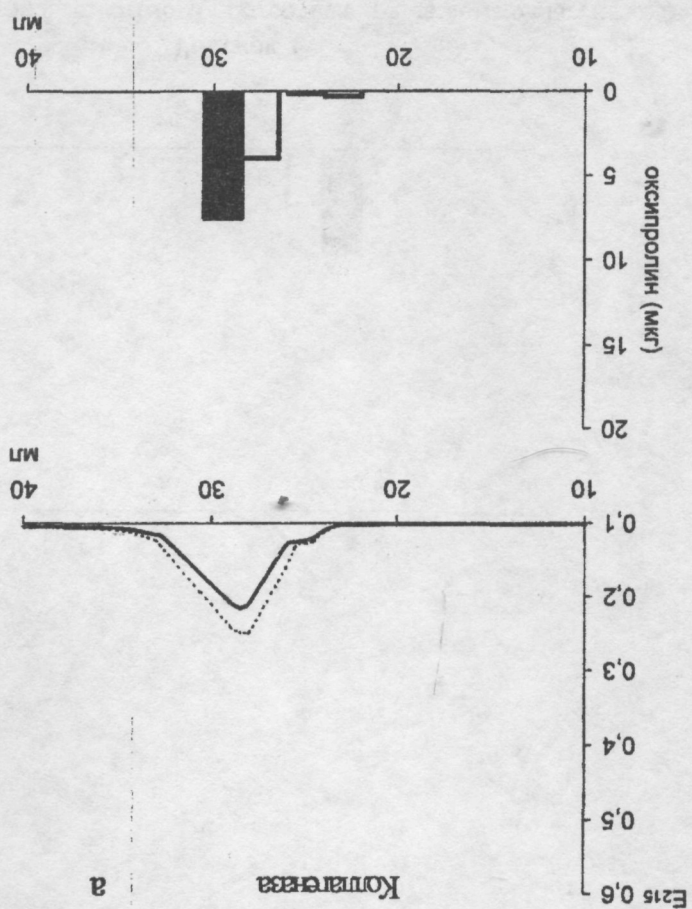
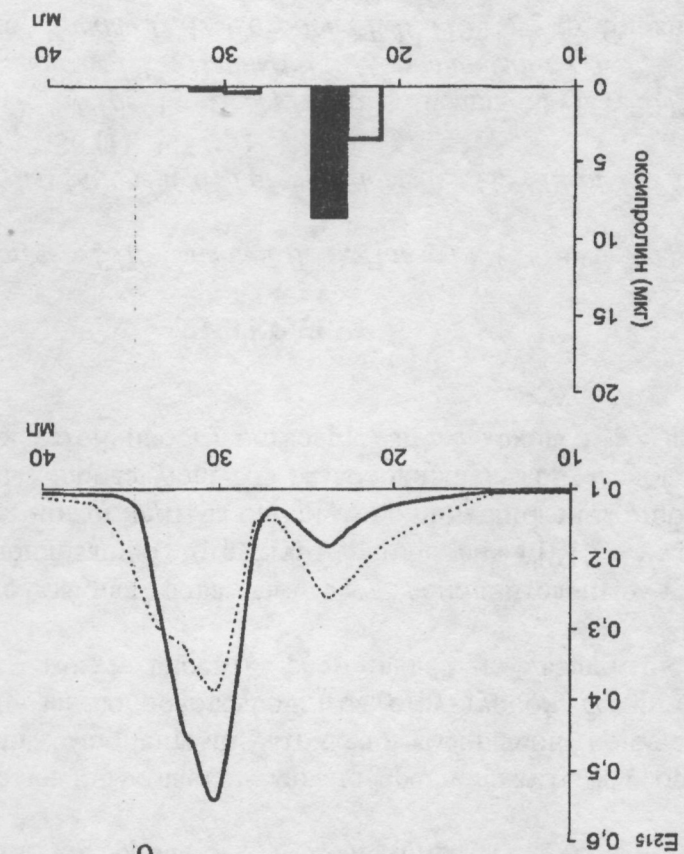
К одной из причин можно отнести известный факт, что наибольшая активность пепсина наблюдается в кислой среде, которая используется в работе. Очевидно, в этом случае происходит дезагрегация молекул коллагена, что способствует большей величине протеолиза коллагена хряща. В отличие от пепсина и проназы коллагеназа способна расщеплять спирализованную часть нативного коллагена [24]. Снижение устойчивости коллагена остеоартрозного хряща к действию коллагеназы является показателем того, что при патологии наряду с отщеплением телопептидных участков коллагена происходит ослабление межмолекулярных поперечных связей, находящихся в спирализованной части молекул коллагена.

С целью изучения структурных изменений коллагена хряща при патологии были исследованы методом гelfильтрации продукты его протеолиза различными ферментными препаратами.

На рис. 2 (а, б, в) видны различия в характере распределения продуктов ферментативного гидролиза коллагена хряща в норме и при ОА. При этом отмечаются количественные различия в величине выхода УФ-поглощающего материала с колонки при 215 нм. При действии коллагеназы (рис. 2 а), фермента, специфически расщепляющего спирализованную часть молекулы коллагена, основная масса продуктов представлена оксипролин – содержащими фрагментами с молекулярной массой в диапазоне от 50000 Д и до 5000 – 1000 Д и ниже. Вместе с тем, частично разрушенный пепсином коллаген хряща (рис. 2 б) как в норме, так и при патологии обнаруживается в виде пептидов с молекулярной массой от 100000 до 2000 Д. При действии проназы на коллаген хряща (рис. 2 в) отмечается четкая корреляция между содержанием УФ-поглощающих веществ и количеством оксипролин-содержащего материала. Однако, выход продуктов незначителен и они представлены в основном оксипролин-содержащими пептидами с молекулярной массой от 20000 до 1000 Д.

При действии всех изученных ферментов повышается выход оксипролин-содержащего материала в случае коллагена хряща при ОА, и это характерно как для высоко-, так и низкомолекулярных продуктов.

Следует подчеркнуть, что при использовании специфического фермента коллагеназы для протеолиза коллагена хряща при ОА преобладает больший выход низкомолекулярных фракций.



Копировано



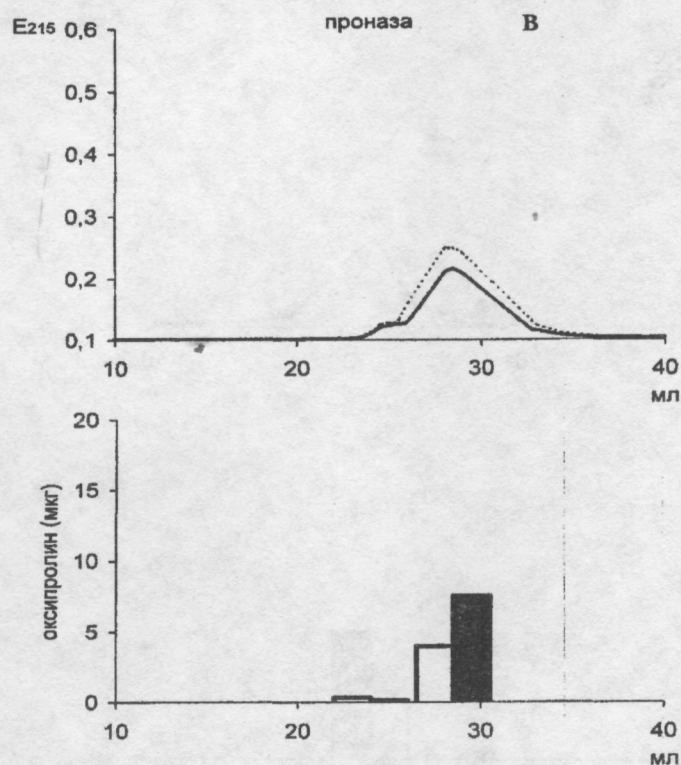


Рисунок 2.

Гель-фильтрация продуктов ферментного протеолиза хряща: а – коллагеназа, б – пепсин, в – проназа; □ норма (—); ■ остеоартроз (---).

На основании полученных данных можно предположить, что ослабление связей между основными компонентами матрикса и уменьшение количества ГАГ в хряще при остеоартрозе, сопровождающиеся структурной дезорганизацией коллагеновых молекул, могут вносить свой вклад в увеличение общего влагосодержания.

Известно, что связанная вода вызывает дополнительную внутри- и межмолекулярную стабилизацию структуры коллагена [21]. Уменьшение фракции связанной воды может явиться одной из причин снижения стабильности коллагеновой молекулы, последующего разволокнения коллагеновой сетки матрикса и уменьшения устойчивости остеоартрозного хряща к механическим нагрузкам.

#### ЛИТЕРАТУРА.

1. Павлова В.Н., Копьева Т.Н., Слуцкий Л.И., Павлов Г.Г. (1988) Хрящ, М., Медицина, 320
2. Bank Rund A., Bayliss Mitchel T., Lafeber Floris R.J.G., Maroudas Alice (1998) Biochem. J., **330** (1), 345-351.
3. Weil L., Svensson O., Hjerpe A., (1997) Arthritis Rheum., **40** (11), 2075-2083.
4. Володина Т.Т., Печенова Т.Н., Пляцко В.В., Ставинский Ю.А., Щинановская А.К., Носаль Н.А., Солодова Е.В. (1991) Укр. Биохим. журн., **63** (4), 47-51.
5. Jnerot S., Heinegard D. (1978) Biochem.J., **169**, 143-156.

6. *Mankin H.J.* (1983) *J. Rheum.*, **10** (9), 7-18.
7. *Basser P.J., Schneiderman R., Ruud A.* (1998) *Archiv. Biochem. Biophys.*, **351** (2), 207-219.
8. *Takahashi M., Suzuki M., Kushida K., Hoshino H., Inoue T.* (1998) *Arthroscopy*, **14** (4), 366-372.
9. *Venn M., Maroudas A.* (1977) *Annals Rheumatic Diseases*, **36**, 399-406.
10. *St. Maroudas A.* (1975) *Bio zheology*, **12**, 233-248.
11. *Mathews M.B., Decker L.* (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 151-159.
12. *Maroudas A., Nachtel E., Grushko G., et al.* (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 285-295.
13. *Antonopoulos C.A., Axelsson J., Heinegard D., Gardell.* (1974) *Biochem. Biophys. Acta*, **338**, 108-119.
14. *Stegemann H., Sadler K.* (1967) *Clin. Chim. Acta*, **18**, 267-273.
15. *Слуцкий Л.И.* (1969) Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани, Ленинград, Медицина, 374 с.
16. *Chandrasekaran E.V., BeMiller J.N.* (1980) *Meth. Carbohydr. Chem.* **8**, 89-96.
17. *Ряброва Г.А., Денисов-Никольский Ю.И.* (1981) *Вопр. мед. химии*, **5**, 694-697.
18. *Вязникова М.Ю., Николаева С.С., Быков В.А., Королева О.А.* (1992) Биомедицинские технологии, М., **10**, 78-80.
19. *Лакин Г.Ф.* (1980) Биометрия, М., Высшая школа, 190 с.
20. *Vassan N.* (1980) *Biochem. J.*, **187**, 781-787.
21. *Львов К.М., Исаков А.А.* (1994) *Биофизика*, **39** (5), 757-760.
22. *Evans P. J.* (1977) *Acta Biol. Med. Germ.*, Bd. **39**, 1555-1562.
23. *Bruckner P., Prockop D.* (1981) *J. Analyt. Biochem.*, **110**, 360-368.
24. *Sellers A., Murphy G.* (1981) *Int. Rev. Connect. Tissue Res.*, **9**, 152-161.

Поступила 09.01.01.

# **THE CHANGES OF BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF COLLAGEN AND NATURE OF WATER IN HUMAN OSTEOARTHROTIC CARTILAGE.**

**KIM ZON CHHOL, V.A. BYKOV, S.S. NIKOLAEVA, G.A. REBROVA, A.A. ROSHINA, N.V. RUMJANTSEVA, L.B. YAKOVLEVA, O.A. KOROLYOVA, L.B. REBROV**

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

The stability of collagen molecules and moisture capacity of human normal and osteoarthrotic (OA) cartilage were studied before and after extraction of glycosaminoglycans (GAG) by 4M guanidinium chloride. The content and nature of water were determined by Fisher titration, DSC and analysis of sorbtion-desorbition processes of water vapour in cartilage. The stability of collagen molecules was determined by the degree of enzymatic hydrolysis: collagenase, pronase and pepsin. It was found that weakenig of bonds between main compounds of the cartilage matrix and decrease of GAG quantities in the OA cartilage were accompanied by structural disorganization of the collagen network, which is manifested by breakdowns of intramolecular bonds in telopeptides and intermolecular bonds in the spiral part of collagen molecules, these changes may contribute to increase of total water in OA cartilage. The correlation of free and bound water fractions in cartilage was increased from 5 to 44 in OA cartilage. These results can be used as a criterion of pathological condition of human articular cartilage.

**Key words:** cartilage, osteoarthrosis, collagen, hexosamines, uronic acid, water – exchange.