

РН-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ В КЛЕТКАХ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ КОЛЕННОГО СУСТАВА И ВЛИЯНИЕ НА НЕГО ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТА

В.И. Шишкин, Г.В. Кудрявцева, А.Б. Рябко

Санкт-Петербургский государственный университет

Резюме

Цель. Изучить особенности протекания биоэнергетических процессов в синовиальной жидкости (СЖ) при остеоартрозе (ОА) и определить степень влияния на них препарата хондроитинсульфата (Структум).

Материал и методы. Проанализировали динамику биоэнергетических параметров СЖ у 15 больных ОА коленных суставов на фоне лечения структумом. Для оценки биоэнергетики СЖ использовали классические ферментативные тесты и полярографический анализ скорости поглощения кислорода клетками СЖ. Сравнивали физиолого-биохимические показатели в период обострения заболевания и после лечения.

Результаты. При ОА происходит существенное смещение рН СЖ в более кислую область и наблюдается трансформация биоэнергетических процессов с результирующим снижением степени энергизации клеток синовии (снижение уровня АТФ и включение резервного энергетического механизма расходования креатинфосфата). Фармакологическая коррекция энергетического обмена клеток СЖ может быть с успехом достигнута с помощью препарата-хондропротектора (Структум).

Заключение. При ОА смещается биоэнергетика СЖ, активируется гликолиз, подключаются резервные биоэнергетические механизмы, усиливается распад креатинфосфата, нарастает разобщение процесса дыхания с окислительным фосфорилированием. Сдвиг рН в более кислую область (от 7,4 в норме до 6,85 при ОА) – пусковой механизм развития обострения ОА. Заместительная терапия полианионным препаратом (Структум) уже через три месяца нормализует рН СЖ, а также ее биоэнергетические параметры.

Ключевые слова: остеоартроз, синовиальная жидкость, биоэнергетика, рН, ферментативные функциональные системы, хондроитинсульфат

Синовиоцитограмма отражает не только клеточный состав синовиальной жидкости (СЖ), но и определяет функциональное состояние сустава, в первую очередь, как органа и как открытой термодинамической и функциональной системы [1 – 3]. При остеоартрозе (ОА) на молекулярном уровне происходит нарушение метаболизма синовиально-капсульного и хрящевого аппарата сустава, а на органном уровне развиваются нарушения конгруэнтности суставных поверхностей. Смещение биоэнергетических параметров клеток СЖ лежит в основе развития патогенетических механизмов стимуляции каспаз – регуляторных ферментативных звеньев апоптоза, активирующих продукцию цитокинов. В дальнейшем именно каскад цито-

кинов во многом обуславливает изменение антигенных детерминант в патогенезе ревматических заболеваний, в частности ОА [4, 5]. Кинетика и термодинамика биоэнергетических процессов, а также состояние клеточного и гуморального иммунитета зависят от значения экстрацеллюлярного рН. В связи с этим целью настоящего исследования явилось: изучение процессов трансформации энергии в клетках СЖ, изменения рН СЖ при ОА коленного сустава, а также оценка динамики этих показателей на фоне лечения структумом (Пьер Фабр, Франция), действующим началом которого является хондроитинсульфат (ХС).

Материал и методы

Проанализированы результаты обследования 15 больных в возрасте $55 \pm 4,5$ лет с достоверным диагнозом ОА коленного сустава II рентгенологической стадии. Пациенты получали препарат Структум

(Пьер Фабр, Франция) по 500 мг два раза в день в течение 3-х мес. Клинический эффект препарата в целом соответствовал общеизвестным данным [6, 7, 10]. СЖ исследовалась до начала лечения (ОА), через три мес от начала лечения (ОА 1) и через один месяц после окончания курса лечения (ОА 2). В условно контрольную группу вошли 8 муж. в возрасте до 45 лет, погибших в результате острой травмы. СЖ извлекалась из сустава не позднее 4 часов после смерти и немедленно обрабатывалась. Определение активности ферментов и уровня интермедиатов углеводно-фосфорного обмена в СЖ проводили спектрофотометрически с помощью классических методов энзимологии [18]. Скорость потребления кислорода клетками СЖ регистрировали полярографическим методом, используя закрытый платиновый электрод типа электрода Кларка. Математические расчеты и статистическую обработку полученных экспериментальных материалов проводили по общепринятым алгоритмам биометрии, включая дисперсионный анализ силы влияний [16, 17], при этом был принят 95% уровень достоверности.

Результаты и обсуждение

Мультифакторная природа патогенеза ОА на определенной стадии развития болезни вызывает внутрикостную гипертензию с очаговой гипоксией и ишемией кости [8,9]. Происходящие изменения биоэнергетических параметров СЖ при этом адекватно отражают динамику происходящих при ОА дезинтегративных метаболических процессов. При развитии ОА в СЖ коленного сустава происходит смещение рН в более кислую область. Так, в норме рН СЖ колеблется в пределах 7,4–7,6, а при ОА нами было зарегистрировано снижение рН до 6,9 (табл.1). Подобное изменение рН при ОА отмечалось ранее в литературе [15]. Это происходит, главным образом, за счет накопления в СЖ лактата (молочной кислоты) вследствие активизации гликолитического пути углеводного метаболизма. К коленному суставу как к открытой термодинамической и функциональной системе вполне применим (по аналогии с мышечной тканью) устоявшийся в физиологии термин «усталость». «Усталость» сустава, возникающая вследствие углубляющейся патологии, распространяется и на клеточный уровень, вынуждая функционировать хондроциты и синовиоциты в режиме «напряжения», что неизбежно влечет за собой изменение биоэнергетических параметров данной функциональной системы в целом [2].

Известно, что для осуществления нормальной каталитической активности ферментов, поддержания осмотического и структурно-функционального гомеостаза клеток необходима тонкая регуляция кислотно-основного равновесия. Ведь даже отклонение рН крови от нормального значения, напри-

Таблица 1
ЗНАЧЕНИЯ рН В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ КОЛЕННОГО СУСТАВА В НОРМЕ, ПРИ ОА И НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОМ СТРУКТУМ

Условия опыта (группы и число пациентов)	Пределы варьирования значений рН
Норма (8)	7,45–7,64
ОА (15) **	7,02–6,85*
ОА 1 (15) ***	7,25–7,43
ОА 2 (15) ****	7,37–7,58

Здесь и далее в таблицах – число обследованных лиц в группах постоянно; * – различие по сравнению с условной нормой – достоверно ($p < 0,05$); ** – до лечения; *** – через 3 мес от начала лечения; **** – через 1 мес после окончания курса лечения

мер, всего на 0,01 ед приводит к развитию патологических процессов в организме, а в отдельных случаях – к летальному исходу [11].

Лечение больных препаратом Структурм вызывало компенсаторное повышение рН СЖ до нижней границы нормы (табл. 1). Дисперсионный анализ силы влияний [16, 17] показал, что эффект препарата на уровень рН в СЖ оказывался достаточно сильным.

Структурм относится к структурно-модифицирующим препаратам – хондропротекторам медленного действия. Достижение лечебного эффекта препарата наблюдается спустя 2–3 мес с начала лечения [6,10]. И это, по нашему мнению, вполне объяснимо, поскольку для создания необходимой концентрации ХС в организме, способного эффективно изменить рН в СЖ, требуется определенное время, а период полужизни большинства гликозаминогликанов (ХС, в частности) составляет в среднем от 72 до 240 часов.

При ОА, сопровождающемся смещением рН СЖ в более кислую область, ускоряется гидролиз АТФ под действием АТФ-аз (табл. 2). Этот факт зафиксирован нами как в отношении общей АТФ-азной активности, так и в отношении активности K^+-Na^+ -активируемой, Mg^{++} -зависимой АТФ-азы, выявляемой на фоне 0,18% оубаина.

Таблица 2
АКТИВНОСТЬ АТФ-АЗ (НМОЛЬ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА /МИН НА 1 МГ БЕЛКА) В СЖ В НОРМЕ, ПРИ ОА И ПРИ ЛЕЧЕНИИ СТРУКТУМОМ

Условия опыта	Общая АТФ-азная активность	АТФ-аза-(K^+-Na^+ -активируемая, Mg^{++} -зависимая)
Норма	$4,0 \pm 0,7$	$2,3 \pm 0,4$
ОА	$7,6 \pm 1,4^*$	$3,8 \pm 0,4^*$
ОА1	$5,2 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,3$
ОА2	$5,0 \pm 1,3$	$2,9 \pm 0,9$

* примечание – см. табл.1

В безъядерных гомогенатах клеток синовиоцитов при ОА выявляется повышенная общая АТФ-азная активность и активность K^+ , Na^+ -активируемой, Mg^{++} -зависимой АТФ-азы соответственно в 1,9 и

1,7 раза по сравнению с условной нормой. Структурм частично нормализовал активность АТФ-азой системы в СЖ, и спустя один месяц после окончания лечения выявленный эффект препарата также сохранялся.

При интерпретации полученных данных следует обратить внимание, прежде всего, на химическую природу используемого медикамента. ХС — естественный компонент хрящевого матрикса, и лечение структурмом — это, по сути, заместительная терапия. ХС является полианионом, т.е. с физико-химической точки зрения он способен ассоциировать большое количество диполей воды и важнейших катионов (Na^+ , K^+ , Ca^{++}), формируя гомеостатические параметры клеток и тканей, такие, например, как тургор, плазмолиз, осмос, рН.

ХС обладает мощным отрицательным зарядом, что предопределяет гидрофильность молекул этого препарата и его позитивное влияние на гидратирование хряща [14]. При ОА в СЖ активируется β -гиалуронидаза, которая катализирует гидролиз β (1→4)-связей активированной формы гиалуроновой кислоты, снижая вязкость раствора. Интересно, что из пяти гомологичных изоформ β -гиалуронидазы в СЖ присутствуют лишь первый, второй и третий изоферменты. При этом именно активность изоформы 2 резко увеличивается (в среднем в 4 раза) при развитии ОА и ревматоидного артрита [15]. Если гиалуронидаза-1 и -3 — сугубо лизосомальные гидролазы, то гиалуронидаза-2 связана с внутриклеточными мембранами. При нормальном значении рН СЖ (табл. 1) β -гиалуронидаза фактически не функционирует. Наиболее интенсивно ферментативный процесс снижения концентрации и молекулярного веса гиалуроната *in vitro* протекает при рН-оптимуме лизосомальных кислых гидролаз (рН = 4,5 – 5,0). Вот почему смещение рН СЖ при ОА в более кислую область следует, по нашему мнению, отнести к основным пусковым патогенетическим механизмам развития этого заболевания.

Весьма значимым смещение рН СЖ оказывается также и для креатинфосфокиназной реакции. Сдвиг рН в более кислую область при ОА вызывает изменение равновесия креатинфосфокиназной реакции, ориентируя его в сторону передачи макроэргической фосфатной группировки от креатинфосфата к АДФ и генерации дополнительного фонда АТФ, реализуемого в процессе воспаления. Именно за счет этого механизма компенсируется дефицит АТФ, возникающий в СЖ при ОА.

Фактически при ОА креатинфосфат является своеобразным запасным резервуаром энергии. Неслучайно при ОА мы наблюдаем значительное возрастание активности креатинфосфокиназы в СЖ пораженного сустава (табл. 3). Нормализующий эффект препарата Структурм на активность креатинфосфокиназы проявляется даже через 1 месяц после окончания лечения.

Таблица 3

АКТИВНОСТЬ КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ (НМОЛЬ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА/МИН НА 1 МГ БЕЛКА) В СЖ В НОРМЕ, ПРИ ОА И ПРИ ЛЕЧЕНИИ СТРУКТУМОМ

Условия эксперимента	Креатинфосфокиназа
Норма	0,7±0,2
ОА	1,9±0,2*
ОА 1	1,3±0,2*
ОА2	1,1±0,4

* примечание — см. табл.1

При ОА изменяется также и относительный вклад процессов гликолиза и дыхания в генерацию АТФ и АДФ, в частности, возрастает по сравнению с нормой удельный вес гликолиза. Как было отмечено ранее, при ОА резко увеличивается продукция лактата, образующегося в ходе терминальной реакции гликолиза. Это обстоятельство указывает на развивающуюся гипоксию в СЖ. При ОА в СЖ накапливается метаболическое «утомление», сопровождающееся сдвигом рН в кислую область.

Нами зарегистрировано также значительное возрастание в СЖ активности фермента центральной гликолитической оксидоредукции — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (табл. 4). Структурм оказывал нормализующее действие на активность этого фермента; его эффект проявлялся даже спустя 1 месяц после прекращения трехмесячного курса лечения. Одновременно с активацией процесса утилизации глюкозы по гликолитическому пути при ОА мы регистрировали полярографически *in vitro* резкое возрастание скорости потребления кислорода клетками СЖ (табл. 5).

Таблица 4.

АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (НМОЛЬ НАД-Н/МИН НА 1 МГ БЕЛКА) В СЖ В НОРМЕ, ПРИ ОА И ПРИ ЛЕЧЕНИИ СТРУКТУМОМ

Условия эксперимента	ГЛ-3-ФДГ
Норма	2,7±0,4
ОА	4,9±0,4*
ОА1	3,7±0,8*
ОА2	3,1±0,5

* примечание — см. табл.1

Таблица 5

СКОРОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА (Н АТ. О₂/МИН. НА 1 МГ БЕЛКА) КЛЕТКАМИ СЖ *IN VITRO* И КОЭФФИЦИЕНТ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ (Р/О) В НОРМЕ, ПРИ ОА И ПРИ ЛЕЧЕНИИ СТРУКТУМОМ (СУБСТРАТ ДЫХАНИЯ -ГЛЮТАМИНОВАЯ КИСЛОТА)

Условия эксперимента	Скорость поглощения кислорода	Р/О
Норма	36,7±6,4	1,7±0,2
ОА	78,9±5,8*	0,9±0,3*
ОА1	54,2±6,2*	1,4±0,3
ОА2	43,7±9,4	1,4±0,2

* примечание — см. табл.1

При синовите коленного сустава примерно вдвое увеличивался уровень потребления кислорода клетками СЖ по сравнению с условной нормой. Лечение препаратом Структурм в течение трех месяцев нормализовало скорость потребления кислорода клетками СЖ, причем эффект препарата сохранялся и спустя один месяц после лечения.

Очевидно, что интенсификация таких важнейших биоэнергетических процессов, как гликолиз и дыхание, напрямую связана с расходом большого количества АТФ на обеспечение воспалительной компоненты развивающегося патологического процесса при ОА и на другие нужды [12]. Таким образом, коленный сустав как открытая термодинамическая и функциональная система при ОА начинает функционировать в режиме напряжения, сопровождающемся катаболическими процессами, а резкое возрастание потребления кислорода и глюкозы клетками СЖ приводит к некоторому компенсаторному увеличению концентрации АДФ, являющегося акцептором фосфатной группы. При этом стимулируется перенос электронов по дыхательной цепи ферментов, повышается активность цитохром-С-оксидазной и сукцинатдегидрогеназной ферментативных систем, как показали наши предыдущие исследования [13].

При развитии ОА на фоне прогрессирующей гипоксии синовиальных клеток происходит глубокое разобщение процесса дыхания с окислительным фосфорилированием и возрастает *in vitro* скорость потребления кислорода клетками СЖ по пути свободного окисления. Так, при использовании в качестве субстрата дыхания глютаминовой кислоты мы отмечали снижение примерно в два раза коэффициента фосфорилирования *P/O* (табл. 5). Скорость дыхания клеток СЖ *in vitro* оказывается чрезвычайно чувствительной к изменению концентрации АДФ. Снижение дыхательного (или акцепторного) контроля в клетках СЖ при ОА убедительно свидетельствует о нарастающем разобщении процесса дыхания с окислительным фосфорилированием.

Лечение структурмом приводит к нормализации активности ферментов энергетического метаболизма, уровня потребления кислорода клетками СЖ и значений коэффициента фосфорилирования. Выявленная динамика ферментов энергетического

обмена в СЖ при ОА подчиняется общей тенденции развивающегося патологического процесса, а хондромодулирующая терапия направлена на подавление дегенеративно-деструктивных изменений, происходящих в суставном хряще, взрыва пролиферативного пула хондроцитов, развития экссудации и синовиального воспаления, активации комплекса кислых лизосомальных гидролаз.

При ОА происходит рН-зависимая трансформация биоэнергетических процессов в СЖ с результирующим снижением степени энергизации клеток синовии (снижение уровня АТФ и включение резервного энергетического механизма расхода креатинфосфата). Фармакологическая коррекция энергетического обмена клеток СЖ может быть с успехом достигнута с помощью препарата — хондропротектора Структурм.

Заключение

При ОА в суставе проявляется аутоэнзимо — и аутоиммунноагрессивные процессы и изменяется, как было установлено нами, биоэнергетика синовиальной ткани, активируется гликолиз, подключаются резервные биоэнергетические механизмы, усиливается распад креатинфосфата, нарастает разобщение процесса дыхания с окислительным фосфорилированием. Самое активное участие в развитии этого патологического процесса принимают клеточные органеллы — митохондрии и лизосомы. Именно дестабилизация митохондриальных и лизосомальных мембран, происходящая на фоне смещения рН в более кислую зону (от 7,4 в норме до 6,85 при ОА), приводит к нарушению деятельности целого ряда ферментативных функциональных систем (ферментов энергетического метаболизма, комплекса кислых гидролитических ферментов), что, по нашему мнению, является пусковыми механизмами развития ОА. Заместительная терапия препаратом полианионом — хондроитинсульфатом (Структурм) уже через три месяца доводит рН СЖ до нижней границы нормы и нормализует другие биоэнергетические параметры клеток СЖ. Препарат Структурм является эффективным и хорошо переносимым фармакологическим средством для лечения дегенеративно-дистрофических заболеваний, в частности ОА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анохин П.К. Очерки по физиологии функциональных систем. М. Медицина, 1975.
2. Кудрявцева Г.В., Шишкин В.И. Динамика ферментативных функциональных систем. СПб, Изд-во СПбГУ, 2000.
3. Fukui N., Purple C.R., Sandell L.J. Cell biology of osteoarthritis: the chondro-cyte's response to injury. *Curr.Rheumatol.Rep.*, 2001, 3 (6), 496-505.
4. Jannonen F., Lapadula G. The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin.Exp.Res.*, 2003, 15(5), 364 — 372.
5. Lotz M., Hashimoto S., Kuhn K., Mechanism of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis. Cartila.*, 1999, 7(4), 389 — 391.
6. Насонов Е.Л., Алексеева Л.И. Хондроитинсульфат (Структурм) при лечении

- остеоартроза: патогенетическое обоснование и клиническая эффективность. Структур. М.: Пьер Фабр; 2002. 2-4.
7. Lippiello L., Grande D. In vivo chondroprotection of glucosamine and chondroitin sulfate in a rabbit model of a O A and demonstration of metabolic synergy on chondrocyte in vitro. *Ann. Rheum. Dis.*, 2000, 59 (suppl. 1), 266.
 8. Mobasheri A. Role of chondrocyte death and hypocellularity in ageing human articular cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis. *Med. Hypothesis*, 2002, 58 (3), 193 – 197.
 9. Futani H.L., Okayama A., Matsui K. et. al. Relation between interleukin-18 and PGE 2 in synovial fluid of osteoarthritis: a potential therapeutic target of cartilage degradation. *J. Immunother.*, 2002, 25, 61-64.
 10. Насонова В.А., Алексеева Л.И., Шемеровская Т.Г. и др. Клиническая эффективность препарата Структур при лечении остеоартроза. *Ревматолог*, 2001, 2, 46 – 51.
 11. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. М, Мир; 1980.
 12. Johnson K., Jung A., Murphy A., et. al. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effect on chondrocyte matrix synthesis and mineralisation. *Arthr. Rheum.*, 2000, 43(7), 1560 – 1570.
 13. Шишкин В.И., Кудрявцева Г.В., Рябков А.Б. Действие препарата Структур (хондроитин-сульфат) на биоэнергетические характеристики синовиальной жидкости при остеоартрозе. *Научно-практич. ревматол.*, 2001, 5, 34-38.
 14. Hardigam T.E., Fosang A.J. Proteoglycans: many forms, many functions. *FASEBJ*, 1992, 6, 681-870.
 15. Yoshida M., Sai S., Marumo K. Expression analysis of three isoforms of hyaluronan synthase and hyaluronidase in synovium of knees in osteoarthritis and rheumatoid arthritis by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Arthrit. Res. Ther.*, 2004, 6, 1 -14.
 16. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Л., Изд. ЛГУ, 1975.
 17. Плохинский Н.А. Дисперсионный анализ силы влияний. Новое в биометрии. М., Изд. МГУ, 1970.
 18. Рябков А.Б., Шишкин В.И., Кудрявцева Г.В. Влияние терапии хондроитинсульфатом на биохимические параметры синовиальной жидкости коленного сустава человека при остеоартрозе. *Электронный журнал «Исследовано в России»* 2004, 250, 2684 – 2695. <http://zhurnal.apc.relarn.ru/articles/2004/250.pdf>.

Поступила 21.06.07

Abstract

V.I. Shishkin, G.V. Kudryavtseva, A.B. Ryabkov

pH-dependent mechanism of energy transformation in synovial fluid cells in knee osteoarthritis and effect of chondroitin sulfate

Objective. To study features of bioenergetic processes in synovial fluid (SF) in osteoarthritis (OA) and to reveal influence of chondroitin sulfate (Structum) on these processes.

Material and methods. SF bioenergetic parameters were analyzed in 15 pts with knee OA receiving structum. SF bioenergetics was assessed with classic enzyme tests and polarographic analysis of oxygen consumption speed by SF cells. Physiological biochemical measures were compared during exacerbation and after treatment.

Results. SF pH in OA is significantly shifted to the acidic diapason and bioenergetic processes are transformed with decrease of synovial tissue cells energetic potential (decrease of ATP level and engaging reserve energetic mechanism of creatine phosphate spending). Pharmacological correction of SF cells energetic metabolism can be achieved with chondroprotector structum.

Conclusion. SF bioenergetics in OA is changed with glycolysis activation, engaging reserve bioenergetic mechanisms, creatine phosphate catabolism up regulation, and increase of dissociation between respiration and oxidative phosphorylation. pH shift to more acidic zone (from normal 7,4 to 6,85 in OA) is a trigger of OA exacerbation. Substitutive therapy with polyanionic drug structum normalizes SF pH and bioenergetic parameters already after three months.

Key words: *osteoarthritis, synovial fluid, bioenergetics, pH, enzyme functional systems, chondroitin sulfate*