

О. П. МикитюкБуковинський державний медичний
університет, м.Чернівці**ДОБОВІ ТА СЕЗОННІ ОСОБЛИВОСТІ
ПРОЦЕСІВ ПРОТЕОЛІЗУ
ТА ФІБРИНОЛІЗУ КРОВІ ХВОРИХ
НА ОСТЕОАРТРОЗ****Ключові слова:** протеоліз, фібриноліз,
остеоартроз.

Резюме. Провідною у патогенезі остеоартрозу є надмірна активність протеаз, наслідком чого є протеолітичне розщеплення компонентів позаклітинного матриксу хряща. Метою дослідження було оцінити добові та сезонні фазові взаємодії в системі протеолізу та фібринолізу за остеоартрозу. Обстежено 88 хворих на остеоартроз, синхронізованих за режимом дня та харчування (середній вік - $51,6 \pm 8,8$ років, тривалість хвороби - $8,4 \pm 4,6$ років), а також 32 здорових добровольці. Досліджено з 6-годинним інтервалом показники: активність протеолізу високо- та низькомолекулярних білків, колагенолітична активність плазми крові; оцінено сумарний, ферментативний та неферментативний фібриноліз. Всі виміри здійснено з використанням стандартних методик. Встановлено, що за остеоартрозу спостерігається збільшення як середньодобових значень активності протеолітичних процесів (в 1,3-1,4 раза), так і зміна характеру добових профілів показників. Значніше змінювалася колагенолітична активність плазми крові: середньодобовий рівень її достовірно зростає за рахунок збільшення варіант в окремі проміжки часу (на 39,2-73,6%). Максимальні зміни виявлено у весняно-осінній період. Фібринолітична активність плазми крові змінювалася помірно - рівномірно збільшена в усі часові проміжки. Очевидно, вечірньо-нічний період, який має бути перехідним від активності до нічного відновлення, є часом мінімальної резистентності організму до дії патогенетичних чинників. Виявлені міжсезонні відмінності рівнів протеолізу та фібринолізу за остеоартрозу, що слід враховувати при плануванні діагностичних і терапевтичних процедур.

Вступ

Остеоартроз (ОА) – поширене дегенеративне захворювання суглобів, при якому провідною рисою патогенезу є деградація екстрацелюлярного матриксу хряща. Враховуючи демографічні тенденції в світі, в тому числі – подовження тривалості життя і збільшення частки літнього населення, ОА, для якого вік вважають провідним фактором ризику, ставатиме дедалі більшим соціально-економічним тягарем для суспільства [6].

Хрящова деструкція здійснюється рядом ензимів; мішенями для них є білкові компоненти позаклітинного матриксу, колаген та агрекани. Здоровий хрящ перебуває у стані динамічної рівноваги між активністю протеаз, які здійснюють фізіологічну репарацію, та їх інгібіторів. Доведено, що при ОА відбувається зсув балансу в сторону протеолізу. В подальшому перебіг остеоартрозу залежить від ключових функцій протеаз: прямого

розщеплення компонентів хряща; активації інших протеаз; регуляції клітинних сигналів (включаючи цитокінові стимули); внутрішньоклітинного розщеплення білків та апоптозу. Одним із факторів внутрішнього дисбалансу в системі протеаз та їх інгібіторів може бути порушення фазових взаємодій між компонентами цієї регуляторної системи [1].

Мета дослідження

Оцінити патологічні процеси, що відбуваються в організмі за ОА; протеолітичну активність крові та активність системи фібринолізу, що включає дію тканинних активаторів плазміногену як одного із факторів коактивації протеаз.

Оцінити періоди максимальної напруженості протеолітичних процесів та мінімальної резистентності організму на підставі вивчення добової і сезонної динаміки протеолітичної активності та системи фібринолізу крові у пацієнтів із ОА.

Матеріал і методи

Обстежено 88 хворих на ОА, що знаходилися на стаціонарному лікуванні у ревматологічному відділенні міської лікарні № 3 м.Чернівці. Співвідношення „жінки-чоловіки” становило 3,8:1, їх середній вік – $51,6 \pm 8,8$ років. Давність захворювання склала $8,4 \pm 4,6$ років. Діагноз ОА встановлювали на основі критеріїв американської ревматологічної асоціації. Всі процедури обстеження відповідали стандартам Гельсінської декларації 1975 р. та її перегляду 1983 р.

Для характеристики добових та сезонних особливостей досліджуваних показників проводили по-сезонний розподіл обстежених пацієнтів (20 пацієнтів обстежено взимку, 28 – навесні, 20 – влітку та 20 – в осінні місяці). Контрольні обстеження виконані в групі практично здорових осіб ($n = 32$), у яких на час обстеження не було хронічної патології органів дихання чи шлунково-кишкового тракту, серцево-судинної системи, а також гострих захворювань за останні 3 місяці. Особи групи контролю були зіставними з пацієнтами з ОА за віком та статтю. Визначення проведені впродовж 24 годин із 6-годинним інтервалом. Всі хворі були синхронізованими за часом прийому їжі та режимом активності/відпочинку (нічний сон – з 23.00 до 7.00).

Проведено обстеження хворих на ОА при поступленні до стаціонару. Протеолітичну активність плазми крові вивчали на підставі показників лізису азоальбуміну (протеоліз низькомолекулярних білків - ПНМБ), азоказеїну (протеоліз високомолекулярних білків - ПВМБ) та азоколу (колагенолітична активність плазми (КАП)). Фібринолітичну активність крові визначали за реакцією з азофібрином з ϵ -амінокапроною кислотою (неферментативна фібринолітична активність - НФА) або без неї (сумарна фібринолітична активність - СФА). Різниця між ними відображала стан ферментної фібринолітичної активності - ФФА.

Математичну обробку отриманих даних проводили з використанням варіаційного статистичного аналізу на IBM PC Pentium III. Достовірність змін варіацій у разі нормального розподілу у вибірках визначали за парним критерієм Стьюдента, в інших випадках – за непараметричним парним Т-критерієм Уілкоксона. Результати вважали вірогідними, коли коефіцієнт вірогідності становив 0,05 або менше. Оцінку характеру ритмів показників проводили з використанням індивідуального та групового Косинор-аналізу, на базі програми Chronos-Fit (Гейдельберг, Німеччина, 2002).

Обговорення результатів дослідження

У хворих на ОА рівномірно в усі відрізки часу збільшувався ПНМБ (рис. 1а) та ПВМБ (рис. 1б)

порівняно з контролем. Співпадало розташування в часі максимумів - о 10.00 та 22.00 для ПВМБ і 14.00-22.00 для ПНМБ; проте, виявляли пролонговану активність ПВМБ – до 2.00 ($p < 0,05$). Ритм ПНМБ втрачав синусоїдальний характер і в середньому за добу вірогідно зростав на 22-26% ($p < 0,05$), а ПВМБ – в 1,3 раза. Максимальних статистично достовірних змін показники зазнавали у вечірні години восени та навесні, за рахунок чого ритм набував значного розмаху між максимальним та мінімальним значенням. Взимку та влітку відмічали незначне – до 15% - наростання показників за остеоартрозу в усі досліджувані часові точки, і діапазон значень хронограми змінювався незначно. Мінімальний рівень протеолітичної активності виявляли о 6.00-10.00.

Максимальних змін за ОА набувала КАП. Ритм хворих осіб не виявляв ознак періодичності. Середньодобове значення КАП за ОА вірогідно зростало – за рахунок збільшення варіант в окремі проміжки часу на 39,2-73,6%. Підвищення КАП за ОА було достовірним у денні години навесні, влітку та восени (на 48,7-60,8%, $p < 0,05$), а в нічний час – упродовж всього року (на 57,8-73,6%; ($p < 0,001$)). Інших міжсезонних відмінностей не виявляли. Максимальні значення КАП спостерігали о 22.00-2.00, тому хронограма пацієнтів із ОА була інверсною щодо контролю (рис.2).

Активність фібринолітичної системи за ОА набувала помірних змін, ступінь прояву яких залежав від часу доби: показники, що вивчалися, достовірно рівномірно зростали впродовж доби - в 1,3-1,5 раза. Періодичність профілів втрачалася, проте положення максимумів співпадало з таким контрольної групи. Ритми СФА (рис. 3), НФА та ФФА були синфазними.

Збільшену активацію фібринолітичної системи плазми спостерігали переважно в нічні години (нічні значення СФА, НФА та ФФА достовірно зростали на 16,2% взимку, 34,8% навесні та 33,6% влітку; достовірний приріст у денний час навесні і влітку склав відповідно 35,4 та 26,7%).

За ОА протеолітична атака спрямована однаково на екстрацелюлярний матрикс (ЕЦМ) і клітинний компонент хряща. Серед зруйнованих волокон колагену багато залишків клітин; їх лізосоми [5], а також поліморфноядерні лейкоцити із синовіальної рідини є додатковими джерелами протеолітичних ферментів широкого спектру. Лізосомальні протеази присутні в клітинах і ЕЦМ здорового хряща, за низького рН, їх активність обмежена найближчою перичелюлярною зоною. Проте, хрящ також містить групу матриксних металопротеїназ (ММП) [2], які можуть руйнувати всі компоненти ЕЦМ за нейтральних значень рН. Кожна із

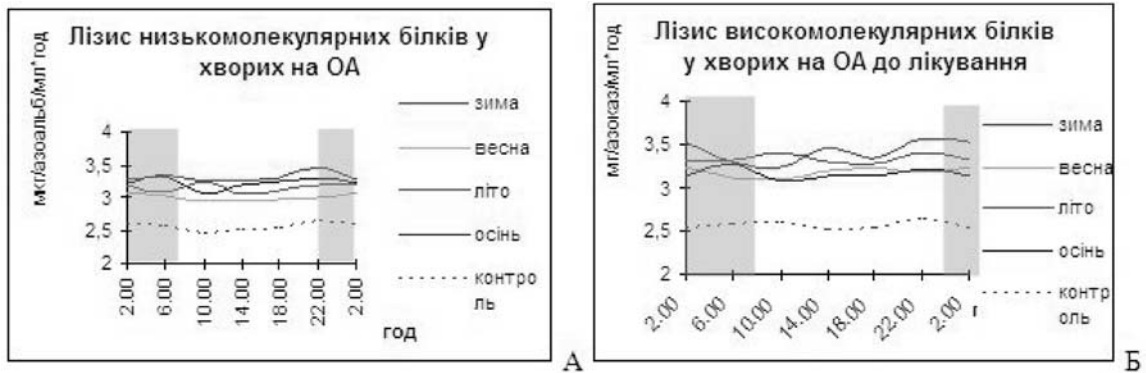


Рис. 1. Добова та сезонна організація плазмового протеолізу хворих на остеоартроз. Протеоліз низькомолекулярних (А) та високомолекулярних (Б) білків

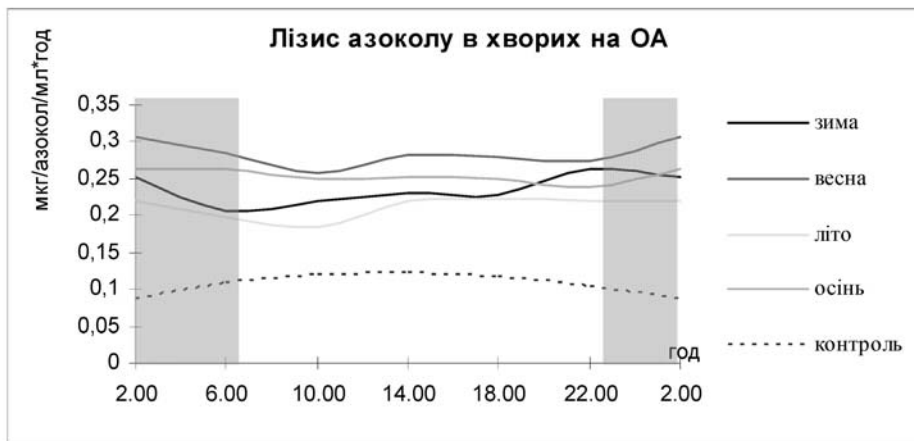


Рис. 2. Добова та сезонна організація колагенолітичної активності плазми хворих на остеоартроз

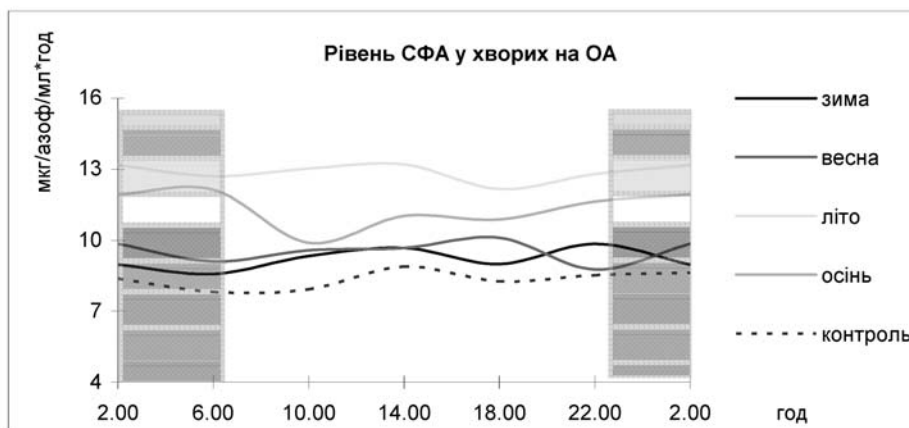


Рис. 3. Добова та сезонна організація плазмового фібринолізу хворих на остеоартроз. Сумарна фібринолітична активність

них секретується хондроцитом як латентний про-ензим, що активується протеолітично. Рівень активності ММП в будь-який час відображає баланс між активацією і пригніченням тканинними інгібіторами. Сімейство ММП містить не менш 27 представників, які розподілені на 5 підгруп за структурною спорідненістю [3].

На початкових стадіях ОА зміни хряща схожі на вікові зі зростанням концентрації колагеназ у

поверхневих зонах. Втрата негативного заряду і розволокнення колагенової мережі, що проявляється як перичелюлярний ореол довкола хондроцитів, - один із перших проявів ОА. Активовані ММП діють в ЕЦМ до їх протеолітичної інактивації, інгібування чи рецептор-опосередкованого ендцитозу та деградації. Останній варіант розглядають як основоположний. Існує специфічний рецептор, після приєднання до якого відбувається інтернал-

ізація, процесинг та екскреція агресивної форми ензиму в деградованій формі, і даний процес за ОА не спрацьовує. У хрящі за ОА зростає експресія ММП-1,2,3,7,8,9,13, що позитивно корелює зі ступенем деградації тканини. Найважливіші - колагеназа-1 (поверхнева зона хряща) та -3 (глибокі шари) (відповідно ММП-1,-13) [2], желатиназа В (ММП-9), стромелізін-1 (ММП-3), мембранна ММП типу 1 (МТ1-ММП). За ОА вони активно деградують свої субстрати (нативний колаген ІІ,ІХ, протеоглікани, фібронектин, ламінін, еластин). Гіперактивність їх розцінюють як відносну (неспроможність інгібіторів деактивувати збільшену кількість ММП [2]), та надмірною кількістю активуючих сигналів.

Після початкового розщеплення колагену типу ІІ він денатурується і зникає. Так порушується контактна взаємодія між клітиною та матриксом, яка опосередкована групою специфічних рецепторів (CD44), і хондроцити набувають нових фенотипових особливостей - гіпертрофуються, експресують нетипові підгрупи інтегринів, які нагадують “фетальний фенотип” (сигнали, що ініціюють формування тканин ембріонального типу, вважають за діяними в постнатальних репаративних процесах) [4]. Паралельно посилюється осифікація матриксу. Продукти деградації колагену й фібронектину активують специфічні інтегрини ($\alpha 5\beta 1$), стимулюючи продукцію ММП і цитокінів ІЛ-1 β та ТНФ α , тим самим замикають “патологічне коло” [4].

З позиції деградації ЕЦМ інтенсивно вивчають активатори плазміногену (АП); два їх типи - урокіназний (уАП) та тканинний (тАП) каталізують конверсію плазміногену в плазмін. Останній деградує протеоглікани, активує проколагенази. Зв'язування тАП з фібрином підвищує власну активність ензиму. Відмічена роль АП і значна активність плазміну в генезі ОА [6] - у синовії порушений плазмінозумовлений протеолітичний баланс і виявлено значну активність уАП. Крім каскаду протеаз, плазмін активує латентні форми факторів ангиогенезу та росту [4]. уАП активує адгезію, збільшуючи афінність до вітронектину та інтегринів, проліферацію клітин синовії, набуття ними інвазивних властивостей. Фібрин і фібриноген є в надлишку у запалених суглобах. Культивування фібробластів у їх присутності призводить до експресії молекул адгезії, продукції ІЛ-8 і рІст-спорідненого онкогена- α (як за стимуляції прозапальними цитокінами). Тобто, депозити фібрину можуть спричиняти рекрутацію (посередництвом хемокінів) та затримку (молекули адгезії) лімфоцитів всередині суглобів за артриту. Активність АП контролюється природними інгібіторами, проте баланс їх за ОА порушений у бік переважання активності перших.

Дослідження ПНМБ та ПВМБ показало, що ритми даних показників у хворих на ОА перебувають у протифазі. Можливо, почергова зміна процесу ПНМБ та ПВМБ відображає етапи поступового лізису протеогліканових компонентів біомембран та екстрацелюлярного матриксу: на висоті ПВМБ нема субстрату для ПНМБ. В міру його наростання (продукти деградації високомолекулярних протеїнів із низькою молекулярною масою) за принципом позитивного зворотнього зв'язку проходить активація ферментів для ПНМБ. Такий антагонізм може також бути пояснений тонкощами регуляції протеолітичної активності плазми інгібіторами, зокрема, $\alpha 2$ -макроглобуліном, який зв'язується із протеолітичними ферментами, що впливають на високомолекулярні білки, обмежуючи їх специфічність низькомолекулярним протеолізом. Тоді час між наступними періодами активації ПВМБ – той, який необхідний для відновлення їх функції або ресинтезу [4]. Протеоліз, який спрямований і на лізис компонентів мембран хондроцитів білкової природи, може мати певне пристосувальне значення, розщеплюючи і фрагментує рецептори до прозапальних субстанцій.

Відомо, що навіть за ОА без вираженого синовіиту між синовіоцитами відкладається певна кількість фібрину. Він тісно контактує з цитолеммою, беручи участь у формуванні грануляції, які нарастають на хрящ, а за несприятливого перебігу захворювання фіброзуються з утворенням шварт. Депозити фібрину, утворюючи асоціати з фібронектином, можуть становити джерело активації і стати фактором набуття інвазивності фібробластів і фіброгенезу [3]. Синфазне з групою контролю збільшення СФА, ФФА, НФА, яке виявляли у хворих на ОА, носить пристосувальний характер. За різними даними, хоча за ОА і відбувається збільшення ФФА, має місце порушення структури плазміногену з утворенням малоактивної форми і реалізацією функції фібринолізу за рахунок НФА.

Висновки

У хворих на ОА виявлено зміну добової організації процесів протеолізу та фібринолізу крові. Очевидно, вечірньо-нічний період, який має бути перехідним від активності до нічного відновлення, є часом мінімальної резистентності організму до дії патогенетичних чинників. Виявлено також міжсезонні відмінності рівнів протеолізу та фібринолізу за остеоартрозу, що слід враховувати при плануванні діагностичних і терапевтичних процедур.

Перспективи подальших досліджень

Врахування хронобіологічних закономірностей описаних біохімічних процесів за остеоартрозу

може стати підґрунтям до розвитку нових терапевтичних стратегій (застосування нових груп препаратів та корекція часу їх призначення).

Література. 1. Комаров Ф.И. Хронобиология и хрономедицина / Ф.И. Комаров, С.И. Рапопорт // М.: Триада-Х. - 2000. - 488 с. 2. Li H. Levels of metalloproteinase (MMP-3, MMP-9), NF-kappaB ligand (RANKL), and nitric oxide (NO) in peripheral blood of osteoarthritis (OA) patients / H.Li, L.Li, J.Min et al. // Clin/Lab. - 2012. - V.58(7-8) / - p. 755-62. 3. Okada A. Progress of research in osteoarthritis. Metalloproteinases in osteoarthritis / A.Okada, Y.Okada // Clin.Calcium. - Nov, 2009. - V.19 (11). - p. 1593-601. 4. Schroepel J.P. Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis / J.P.Schroepel, J.D.Crist, H.C.Anderson, Wang J. // Histol. Histopathol. - Mar, 2011. - 26(3). - p. 377-94. 5. Swingler T.E. Degradome expression profiling in human articular cartilage/ T.E.Swingler, J.G.Waters, R.K.Davidson et al. // Arthritis Res.Ther. - 2009/ - V.11(3). - p. R96. 6. Troeberg L. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis / L.Troeberg, H.Nagase // Biochim. Biophys. Acta - Jan., 2012. - V. 1824(1). - p. 133-45.

СУТОЧНЫЕ И СЕЗОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ ПРОТЕОЛИЗА И ФИБРИНОЛИЗА КРОВИ БОЛЬНЫХ С ОСТЕОАРТРОЗОМ

О.П.Микитюк

Резюме. Ведущей в патогенезе остеоартроза является чрезмерная активность протеаз, следствием чего является протеолитическое расщепление компонентов внеклеточного матрикса хряща. Целью исследования было оценить суточные и сезонные фазовые взаимодействия в системе протеолиза и фибринолиза при остеоартрозе. Обследовано 88 больных остеоартрозом, синхронизированных по режиму дня и питанию (средний возраст - $51,6 \pm 8,8$ лет, длительность заболевания - $8,4 \pm 4,6$ года), и 32 здоровых добровольца. Исследовано с 6-часовым интервалом показатели: активность протеолиза высоко- и низкомолекулярных белков, колагенолитическая активность плазмы крови; оценено ферментативный, неферментативный и суммарный фибринолиз. Все измерения проведены с использованием стандартных методик. Установлено, что при остеоартрозе наблюдается увеличение как среднесуточных значений активности протеолитических процессов (в 1,3-1,4 раза), так и изменение характера суточных профилей показателей. Значительнее изменялась колагенолитическая активность плазмы крови: среднесуточное ее значение достоверно возрастало за счет увеличения вариантов в отдельные промежутки времени (на 39,2-73,6%). Максимальные изменения выявлено в весенне-осенний период. Фибри-

нолитическая активность плазмы крови изменялась умеренно - равномерно увеличена во все отрезки времени. Вероятно, вечерне-ночной период, который должен быть переходным от активности к ночному восстановлению, является временем минимальной резистентности организма к действию патогенетических факторов. Выявлены межсезонные отличия уровня протеолиза и фибринолиза при остеоартрозе, что следует учитывать при планировании диагностических и терапевтических процедур.

Ключевые слова: протеолиз, фибринолиз, остеоартроз.

DAILY AND SEASONAL PECULIARITIES OF BLOOD PROTEOLYSIS AND FIBRINOLYSIS PROCESSES IN PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS

O. P. Mykytyuk

Abstract. Extensive activity of proteases dominates in osteoarthritis pathogenesis and proteolytic breakdown of extracellular matrix components is a consequence of that. Estimation of daily and seasonal phase interactions of components of proteolysis and fibrinolysis systems in case of osteoarthritis was the aim of the investigation. 88 patients with osteoarthritis synchronized by daily activity and meals intake regimen were examined (average age $51,6 \pm 8,8$ years, disease duration - $8,4 \pm 4,6$ years), as well as 32 healthy volunteers. Next values: activity of proteolysis of high and low-molecular proteins, collagenolytic activity of blood serum; summary, enzymatic and non-enzymatic fibrinolysis were investigated with 6-h interval. All measurements were performed employing standard methods. Increase of average daily levels of proteolytic processes activity (by a factor of 1,3-1,4 times) as well as change of daily profiles character of values was established. Collagenolytic activity of blood serum changed more markedly: its daily average level significantly increased at account of variants increase in different time points (39,2-73,6%). Maximal changes were detected at spring-autumn period. Fibrinolytic activity of the blood changed moderately - it was increased uniformly in all time points. Apparently, evening-night period that must be transient from activity to night reparation, is *locus resistantiae minoris* of organism sensibility to harmful factors. There were multiple interseasonal proteolysis and fibrinolysis differences detected in osteoarthritis that should be taken into account when scheduling diagnostic and treatment procedures.

Key words: proteolysis, fibrinolysis, osteoarthritis.

Bukovyna State Medical University

Clin. and experim. pathol. - 2013. - Vol.12, №2 (44). - P.121-125.

Надійшла до редакції 17.05.2013

Рецензент - проф. О.І.Федів

© О. П. Микитюк, 2013