

Budowa i zastosowanie wybranych glikozoaminoglikanów

JOANNA ZEYLAND^{*/***}, DANIEL LIPIŃSKI^{**}, WOJCIECH JUZWA^{*},
ANDRZEJ PŁAWSKI^{**}, RYSZARD SŁOMSKI^{*/**}

^{*}Katedra Biochemii i Biotechnologii Wydziału Rolniczego AR w Poznaniu, ul. Wołyńska 32, 60-637 Poznań

^{**}Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

^{***}Delta Pharma BV, ul. Lubicz 25, 31-503 Kraków

Zeyland J., Lipiński D., Juzwa W., Pławski A., Słomski R.
Structure and application of select glycosaminoglycans

Summary

Proteoglycans can be found in the extracellular matrix of most tissues. They play the role of receptors, take part in cellular adhesion and also interactions between cells. Proteoglycans consist of proteins with one or more covalently bonded glycosaminoglycans. There are seven different types of glycosaminoglycans: hyaluronic acid, heparin and sulphates of chondroitin, keratan I and II, heparin and dermatan. Hyaluronic acid and chondroitin sulphate appear in synovial fluid where they take part in binding water, preventing mechanical stress and increasing elasticity. Keratan sulphate and chondroitin sulphate are used as potential markers of osteoarthritis. Osteoarthritis is a type of arthritis that is caused by the breakdown and eventual loss of the cartilage of one or more joints. Cartilage is a protein substance that serves as a cushion between the bones of the joints. Dermatan sulphate is responsible for the individual resistance to inflammation and pathogens. Understanding the mechanisms of interactions between glycosaminoglycans and pathogens will help to develop more effective vaccinations. The perfect functioning of glycosaminoglycans depends on the efficient activity of both synthesising and degrading enzymes. Even small dysfunctions cause major diseases and disorders.

Keywords: glycosaminoglycans, proteoglycans, osteoarthritis, joint

Proteoglikany są białkami zawierającymi jeden lub więcej kowalencyjnie połączonych łańcuchów glikozoaminoglikanów (GAG). Wyjątek stanowi kwas hialuronowy, który nie tworzy kowalencyjnego wiązania z rdzeniem białkowym. Występują na powierzchni komórek i w zewnątrzkomórkowej substancji podstawowej organizmów zwierzęcych. Dotychczas rozpoznano 7 podstawowych rodzajów glikozoaminoglikanów: kwas hialuronowy, heparynę oraz siarczan: chondroityny, keratanu I i II, heparanu i dermatanu.

Glikozoaminoglikany charakteryzują się strukturą liniową utworzoną w wyniku polimeryzacji dwucukrów składających się z aminocukru (D-glukozyaminy lub D-galaktozaminy) oraz kwasu uronowego (D-glukuronowego lub L-iduronowego). W przypadku siarczanu keratanu miejsce kwasu uronowego zajmuje galaktoza. Przynajmniej jeden z cukrów w powtarzającej się jednostce disacharydu ma ujemnie naładowaną grupę karboksylową lub siarczanową. Utworzone łańcuchy łączą się z rdzeniem białkowym poprzez trisacharyd Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl związany z resztą seryny białka rdzeniowego wiązaniem O-glikozydowym, charakterystycznym dla większości glikozoaminoglikanów. Siarczan keratanu może łączyć się z rdzeniem

białkowym za pośrednictwem wiązań O-glikozydowych tworzących się pomiędzy N-acetylogalaktozaminą a resztą seryny bądź treoniny lub N-glikozydowych pomiędzy N-acetyloglukozoaminą a resztą asparaginy. Po przyłączeniu trisacharydu do rdzenia białkowego następuje polimeryzacja GAG na końcowej reszcie galaktozy. Biosynteza rdzeni białkowych zachodzi w siateczce śródplazmatycznej, natomiast glikozoaminoglikany powstają i są modyfikowane w aparacie Golgiego. Modyfikacja GAG w aparacie Golgiego polega głównie na epimeryzacji kwasu glukuronowego do iduronowego, którą przeprowadzają właściwe epimerazy oraz przyłączeniu grupy siarczanowej w pozycji 2, 3, 4 i/lub 6 węgla aminocukru przez wyspecyficzne sulfotransferazy. Źródłem reszty siarczanowej jest w tym przypadku 3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiaraczan (PAPS) zwany aktywnym siarczanem (13).

Cząsteczki proteoglikanów są składnikiem macierzy pozakomórkowej (ECM) większości tkanek organizmu, gdzie wiążą się, między innymi, z fibronektyną i lamininą. Występują na powierzchni różnego typu komórek, gdzie mogą pełnić rolę receptorów, biorąc udział w adhezji komórkowej oraz oddziaływaniach

międzykomórkowych. Oddziałując z kolagenem i elastyną utrzymują właściwą strukturę tkanki łącznej. Jako polianiony mogą wpływać na selektywność zależnej od ładunku filtracji kłębuszkowej. Proteoglikany zaangażowane są również w szereg procesów związanych z onkogenezą. Zmiany jakościowe i ilościowe tych makrocząsteczek w macierzy mogą prowadzić do aktywacji niektórych onkogenów.

Kwas hialuronowy

Kwas hialuronowy (HA) należy do nierozgałęzionych glikozoaminoglikanów nie tworzących wiązań kowalencyjnych z rdzeniem białkowym. Wchodzi w skład substancji międzykomórkowej tkanki łącznej, mazi torebek stawowych, występuje w skórze oraz ciałku szklistym oka. HA w dużych ilościach znajdujemy w tkankach embrionalnych, gdzie bierze udział w procesach naprawczych oraz migracji komórek w morfogenezie. Zbudowany jest z powtarzającego się dwucukru, w którego skład wchodzi kwas glukuronowy oraz N-acetyloglukozoamina. HA poprzez wiązanie i zatrzymywanie wody w przestrzeniach międzykomórkowych zwiększa także odporność tkanek na stres mechaniczny. Wraz z siarczanem chondroityny zapewnia tkance sprężystość i wytrzymałość. Pochodne kwasu hialuronowego są substancjami immunoneutralnymi oraz apirogennymi. Powstałe na drodze estryfikacji grup karboksylowych kwasu D-glukuronowego polimery stosowane są do powlekania powierzchni implantów, protez i biomateriałów, a także w systemach dystrybucji leków w organizmie. W dermatologii plastycznej stosuje się pochodne kwasu hialuronowego do zwiększania objętości tkanek miękkich na drodze podskórnych iniekcji (18).

Łatwo tolerowane przez organizm, nie wywołujące odpowiedzi ze strony układu immunologicznego preparaty zawierające pochodne kwasu hialuronowego, pozyskiwanego z grzebieni kogutów wykorzystywane są również w plastyce korekcyjnej nosa, przeszczepach skóry, usuwaniu zmarszczek i blizn czy leczeniu skórnej atrofii. Źródłem kwasu hialuronowego mogą być również bakterie z rodziny *Streptococcus*. Jednakże preparaty otrzymywane z tych bakterii charakteryzują się silniejszymi właściwościami uczulającymi (18).

Od kilku lat kwas hialuronowy znajduje również zastosowanie w leczeniu perforacji błony bębenkowej (5). W przypadku dużych i całkowitych ubytków stosuje się zwykle przeszczepy autologiczne fragmentów chrząstki elastycznej małżowiny usznej. W terapii zamykania małych perforacji najbardziej skuteczne okazują się techniki angażujące czynniki wzrostu: EGF (epidermal growth factor), FGF-2 (fibroblast growth factor) oraz kwas hialuronowy. Substancje te biorą udział w naturalnych procesach naprawczych błony bębenkowej. Odpowiedzialne są za pobudzanie hiperkeratyzacji, proliferację komórek nabłonka oraz ich migrację, co prowadzi do zamknięcia krawędzi uszkodzenia (5).

Niedobór HA może prowadzić do podatności na infekcje typu bakteryjnego, stany zapalne stawów oraz mechaniczne uszkodzenia tkanek. Pewne patogenne szczepy bakterii posiadają zbudowaną z glikozoaminoglikanów zewnętrzną otoczkę polisacharydową niezbędną w procesie inwazyjnym (10). Obecność GAG, na powierzchni ściany komórkowej bakterii, podobnych do glikozoaminoglikanów gospodarza powoduje, iż patogen nie jest rozpoznawany przez przeciwciała. Taki system ochrony przed fagocytozą oraz aktywacją systemu dopełniacza stosują, między innymi, Gram-ujemne *Pasteurella multocida* typ A oraz Gram-dodatnie *Streptococcus* grupy A i C (6, 10). Wysoka lepkość substancji zawierających kwas hialuronowy utrudnia przenikanie przez nie czynników patogennych, zwłaszcza bakterii, chroniąc w ten sposób tkanki przed infekcją (29).

Heparyna

Heparyna (HEP) należy do siarczanowanych polisacharydów o masie cząsteczkowej 5-20 kDa o jednostkach cukrowych połączonych 1,4-glikozydowymi wiązaniami. Występuje głównie w ziarnistościach komórek tłuszcznych, wątrobie, mięśniach, płucach, sercu, nerkach oraz śledzionie, a także w skórze i krwi. Heparyna zbudowana jest z powtarzającej się sekwencji disacharydu: glukozoaminy oraz kwasu glukuronowego. Po syntezie polisacharydu 90% reszt kwasu glukuronowego ulega epimeryzacji do kwasu iduronowego. Rdzeń białkowy zbudowany jest wyłącznie z reszt seryny oraz glicyny, z czego około 67% reszt seryny łączy się z heparyną (28).

Heparyna reguluje proces angiogenezy, moduluje lipazy lipoproteinowe, a także odpowiada za zahamowanie proliferacji mięśni gładkich po przebytych urazach (28). Heparyna produkowana jest głównie przez mastocyty, czyli komórki tłuszczne, a w mniejszym stopniu przez bazocyty (granulocyty zasadochłonne) (24).

Heparyna posiada właściwości antykoagulacyjne. Łącząc się z występującą w osoczu antytrombiną III przyspiesza proces inaktywacji proteaz serynowych, do których należy trombina. Oddziaływanie heparyny z antytrombiną następuje bezpośrednio poprzez przyłączenie glikozoaminoglikanu do reszt lizyny enzymu i zmianę jego konformacji, a pośrednio przez specyficzne wiązanie się z lipazą lipoproteinową obecną w naczyniach włosowatych pobudzającą sekrecję antytrombiny. Utworzony kompleks zbudowany z heparyny, antytrombiny III oraz proteazy serynowej rozpada się na nieaktywny kompleks ATIII–proteaza oraz cząsteczkę heparyny, która łączy się z kolejną cząsteczką antytrombiny III. Tworzenie się połączeń heparyny z antytrombiną III ma hamujące działanie na IX, X, XI i XII czynnik koagulacyjny oraz na kalikreinę (20).

Kliniczne zastosowanie heparyny związane jest z wykorzystaniem jej właściwości antykoagulacyjnych. Na pojawienie się i rozwój zakrzepicy żyłnej ma wpływ

niewłaściwa pierwotna i wtórna budowa oraz kształt naczyń krwionośnych obserwowane u pacjentów po przebytych operacjach neurochirurgicznych, ortopedycznych, urazach czaszki, oparzeniach termicznych czy rozległych zawałach serca. Prawdopodobieństwo rozwinięcia się zakrzepicy żyłnej u osób po zabiegach operacyjnych może dochodzić do 28%, a w przypadku złamań kości biodrowej nawet do 50%. W konsekwencji u około 2% wyżej wymienionej populacji pacjentów dochodzi do śmiertelnego zejścia na skutek powstania zatoru płucnego. Kolejnymi czynnikami ryzyka są zaburzenia przepływu krwi w naczyniach krwionośnych spowodowane, między innymi, ciążą i położeniem, otyłością, zawałem mięśnia sercowego, przedłużającym się unieruchomieniem, a także zmiany składu i właściwości krwi będące skutkiem, na przykład, terapii estrogenowej.

Niskocząsteczkowa heparyna jest skutecznym i powszechnym lekiem wykorzystywanym w zapobieganiu i leczeniu zakrzepic, miażdżycy, usprawnianiu przepływu krwi w naczyniach wieńcowych i obwodowych czy indukowaniu angiogenezy. Heparynę wysokocząsteczkową należy stosować ostrożnie, gdyż może wywoływać krwotoki i krwawienia (1-10%), stany zapalne żył, odczyny skórne oraz indukować trombocytopenię, hipertransaminazemię, a przy długotrwałym leczeniu prowadzić do osteopenii i osteoporozy (3). Niskocząsteczkowa heparyna może być aplikowana w dłuższym czasie, a okres jej półtrwania jest od dwóch do trzech razy dłuższy od czasu półtrwania natywnej, niefrakcjonowanej heparyny.

W czasie przeprowadzania zabiegów hemodializy oraz wszczepiania bajpasów krew kontaktująca się z materiałami syntetycznymi podlega procesowi koagulacji, co wymusza stosowanie antykoagulantów. Prowadzi się badania nad fizyczną oraz chemiczną immobilizacją heparyny do membran, które pokrywałyby zarówno sprzęt, narzędzia, jak i materiały operacyjne, gdyż infuzje heparynowe mogą prowadzić do wystąpienia skaz krwotocznych (19).

Myszy z uszkodzonym jednym z czterech genów kodujących N-deacetylazy/N-sulfotransferazy nie są zdolne do produkcji heparyny. Zwierzęta te charakteryzują się normalną żywotnością oraz płodnością, posiadają jednak mniejszą liczbę mastocytów, a niedobór heparyny powoduje zaburzenie ich funkcji wydzielniczej (11).

Siarczany heparanu, dermatanu, keratanu i chondroityny

Siarczan heparanu (HS) należy do grupy glikozaminoglikanów zbudowanych z monomerów kwasu D-glukuronowego oraz N-acetyloglukozoaminy. Reszty N-acetyloglukozoaminy mogą być podstawiane kilkoma grupami siarczanowymi. HS wbudowany w błonę plazmatyczną odpowiada za jej sprężystość. Bierze udział w przenoszeniu informacji poprzez przejmowanie funkcji receptorowej oraz uczestniczy w oddzia-

ływaniach między komórkami. Siarczan heparanu może oddziaływać z czynnikami wzrostu, czynnikami adhezyjnymi oraz enzymami.

HS uczestniczy w procesach rozwojowych, regulując aktywność morfogenów *wingless* oraz *hedgehog* będących segmentowymi genami polarności *Drosophila melanogaster*. Mutacje w genie dehydrogenazy UDP-glukozy, której produktem jest kwas UDP-glukuronowy prowadzą do zablokowania tworzenia się łańcuchów GAG, a w rezultacie do zaburzenia funkcji genów *wingless* oraz *hedgehog*. Gen *hedgehog* wydaje się bardziej wrażliwy na niedobór łańcuchów siarczanu heparanu. Hamujące działanie mutacji w genie dehydrogenazy dotyczy również działania na czynnik wzrostu fibroblastów (FGF). Podobny wpływ na zaburzenia aktywności wyżej wymienionych genów mają mutacje w genach N-deacetylazy/N-sulfotransferazy odpowiedzialnych za początkowe modyfikacje łańcucha heparanu. Błędne modyfikacje lub ich brak prowadzą do utraty funkcji GAG (9).

Mutacje w genie 2-O-sulfotransferazy siarczanu heparanu powodują niewłaściwą polaryzację brzusznej oraz grzbietową u *Drosophila*, a także niewłaściwe formowanie nerek u myszy. Siarczan heparanu wbudowywany jest w błony podstawne komórek kłębuszków nerkowych, gdzie wraz z innymi związkami odpowiada za selektywność filtracji zależnej od ładunku. Zmiany w jego strukturze wpływają na nieprawidłowe funkcjonowanie nerek, a także towarzyszą nefropatiom o różnej etiologii (27).

Niektóre organizmy patogenne, takie jak: wirus Dengue'a, wirusy herpes (HSV 1), sporozycytry malarii czy dwuinki rzeżączki wykorzystują siarczan heparanu obecny na powierzchni komórek jako receptor podczas wiązania się do komórek gospodarza (16). Bliższe poznanie mechanizmów chorobotwórczych zależnych od siarczanu heparanu pozwoli na opracowanie strategii oraz zaprojektowanie leków chroniących człowieka przed tymi groźnymi patogenami.

Siarczan dermatanu (DS), nazywany również siarczanem chondroityny B, zamiast kwasu D-glukuronowego występującego w siarczanie chondroityny, związanego z N-acetylogalaktozaminą wiązaniem $\beta 1,3$, posiada kwas L-iduronowy połączony wiązaniem $\alpha 1,3$. Podczas syntezy tego GAG dochodzi do epimeryzacji kwasu D-glukuronowego do L-iduronowego przy udziale 5-epimerazy. Proces epimeryzacji jest procesem regulowanym poprzez stopień siarczanowania łańcuchów GAG. Przy niedostatecznej ilości reszt siarczanowych w pozycji C4 oraz C6 heksoaminy, a także C2 kwasu iduronowego, siarczan dermatanu staje się mieszaniną disacharydów, zbudowanych z N-acetylogalaktozaminą połączoną z kwasem D-glukuronowym lub L-iduronowym. Siarczan dermatanu wchodzi w skład proteoglikanów bogatych w leucynę, takich jak dekoryna czy biglikan, jest również składową wersykanu oraz agrekanu będących dużymi cząsteczkami polisacharydowymi.

DS wchodzi w skład śródbłonna naczyń krwionośnych. Produkowany jest głównie przez miocyty naczyńniowe, które w procesie miażdżycowym silnie proliferują. Ma zdolność łączenia się z osocзовymi lipoproteinami o niskiej gęstości. Badania wskazują, że to właśnie siarczan dermatanu jest odpowiedzialny w dużej mierze za rozwój blaszki miażdżycowej (14). Siarczan dermatanu obecny jest w rogówce oka, zapewniając jej przezroczystość, a także w twardówce, gdzie odpowiedzialny jest za utrzymanie właściwego kształtu gałek ocznych.

Siarczan dermatanu zwiększa aktywność antykoagulatoryjną kofaktora heparyny II (HC II) około 1000-krotnie. Kompleks, jaki tworzy się między siarczanem dermatanu, fibryną oraz trombiną znacznie różni się od tego, jaki tworzy z nimi heparyna. Heparyna przyłącza zarówno trombinę, jak i fibrynę, tworząc w ten sposób kompleks zdolny do blokowania centrum aktywnego kofaktora heparyny II. Natomiast siarczan dermatanu przyłącza się bezpośrednio tylko do trombiny, zapobiegając jej łączeniu z fibryną. Siarczan dermatanu okazał się skuteczny w walce z objawami zakrzepicy u pacjentów, którzy przeszli operacyjne usunięcie nowotworu, a uzupełniające się właściwości heparyny i siarczanu dermatanu mogą przyczynić się do opracowania efektywnego leku o właściwościach antykoagulatoryjnych.

DS zawdzięcza swoją nazwę skórze właściwej, w której stanowi 0,3% suchej masy. Uczestniczy w procesie koagulacji, wroście komórek, ochronie przed czynnikami patogennymi, a także bierze udział w naprawie uszkodzeń skóry. Miejscowe stężenie siarczanu dermatanu w uszkodzonej skórze może wzrastać nawet do 23 µg/ml (26). W przypadku zranień obserwuje się lokalne wzmoczenie syntezy i akumulacji na powierzchni komórek śródbłonna oraz hiperproliferujących keratynocytów: syndekanu 1, a także wzrost stężenia syndekanu 4 i dekoryny. Myszy niezdolne do syntezy syndekanu 4 charakteryzują się dłuższym okresem gojenia ran niż myszy zdolne do jego produkcji (7). Zaobserwowano również, że wzrost stężenia syndekanu 1 i syndekanu 4 wpływa na bliznowacenie ran. Uszkodzenia skóry płodowej nie podlegają temu procesowi ze względu na niską zawartość wcześniej wymienionych syndekanów.

Siarczan dermatanu aktywuje mechanizmy przylegania tocących się po warstwie płytek krwi leukocytów poprzez stymulację cząsteczek adhezyjnych ICAM-1, a proteoglikany zawierające siarczan dermatanu promują aktywność czynnika wzrostu fibroblastów FGF-2, wzmagając podziały komórkowe (25). Siarczan dermatanu bierze także udział w tworzeniu immunologicznej bariery dla patogenów.

DS oraz proteoglikany zawierające siarczan dermatanu są czynnikami mogącymi modyfikować osobniczą odporność na infekcje. Myszy, które nie syntetyzują dekoryny, są bardziej odporne na infekcję *Borrelia burgdorferi*, bakterii odpowiedzialnej za wywoły-

wanie boreliozy z Lyme. Głównym mechanizmem patogenyzy jest krzyżowe wiązanie bakteryjnego białka OspA z integrzyną CD11a/CD18 (LFA-1), czego konsekwencją jest adhezja limfocytów T do komórek prezentujących antygen oraz wzmoczenie ich aktywacji. Prowadzi to do rozwinięcia się stanu zapalnego w obszarze stawów, charakterystycznego dla infekcji tą bakterią (4).

Prawdopodobnie DS odpowiedzialny jest również za oddziaływanie z *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* czy *Streptococcus pyogenes*. Organizmy te wytwarzają proteiny, które uwalniają łańcuchy siarczanu dermatanu z proteoglikanu. Wolne łańcuchy siarczanu dermatanu łączą się z α -defensynami, blokując ich aktywność. Defensyny należą do grupy antybiotyków peptydowych. Mechanizm ich działania opiera się na uszkodzaniu i wytwarzaniu kanałów w błonie komórkowej patogenów (23). Zrozumienie mechanizmów oddziaływania GAG z organizmami chorobotwórczymi może w przyszłości wpłynąć na możliwość manipulowania ich patogennością oraz przyczynić się do opracowania nowych, skuteczniejszych szczepionek.

Siarczan keratanu (KS) należy do grupy GAG zbudowanych z powtarzających się jednostek galaktozy połączonej z N-acetyloglukozoaminą. Wyróżnia się dwa typy siarczanu keratanu. Siarczan keratanu typu I wraz z siarczanem dermatanu występują w rogówce oka. Umiejscowione pomiędzy włóknami kolagenowymi nadają rogówce przezroczystość. Siarczan keratanu typu II występuje głównie w luźnej tkance łącznej. Zarówno typ I, jak i II keratanu może ulegać siarczanowaniu w pozycji C6 N-acetyloglukozoaminy, a w pewnych sytuacjach siarczanowanie dotyczy galaktozy.

Keratany różnią się od siebie sposobem wiązania do rdzenia białkowego. W siarczanie keratanu typu I N-acetyloglukozoamina łączy się wiązaniem N-glikozydowym z resztą asparaginy, a w typie II N-acetyloglukozoamina tworzy wiązanie O-glikozydowe z resztą seryny bądź treoniny. Keratany wchodzi w skład komórek nabłonka, gdzie biorą udział w naprawie uszkodzeń powierzchni, a także w skład komórek nerwowych, gdzie odpowiedzialne są za prawidłowe przewodzenie sygnałów. Uczestniczą również w procesie zagnieżdżania się zarodka (8).

Siarczan chondroityny (CS) zbudowany jest z 25-40 powtarzających się jednostek dwucukru (kwas glukuronowy oraz N-acetylogalaktozoamina) o masie cząsteczkowej 12-20 kDa. Reszta N-acetylogalaktozoaminy może ulegać podstawieniu siarczanem w pozycji 4 lub 6. CS stanowi około 80% GAG obecnych w chrząstce stawowej. Proteoglikany zawierające CS występują również w aorcie, mięśniach szkieletowych, oku, płucach oraz mózgu.

W przypadku zapalenia stawów obserwuje się zróżnicowanie w poziomie siarczanowania N-acetylogalaktozoaminy w chrząstce i mazi stawowej (15). CS

wytwarzany jest w aparacie Golgiego, a następnie transportowany do macierzy międzykomórkowej, gdzie tworzy makrocząsteczki bądź też lokalizowany jest na powierzchni komórek (22). Połączony z kwasem hialuronowym za pomocą białek wiążących utrzymuje właściwą strukturę, sprężystość i wytrzymałość tkanki chrzęstnej. Z wiekiem zmniejsza się zawartość tego GAG w chrząstce, co może prowadzić do rozwoju zmian zwyrodnieniowych u starszych osobników. Jego obecność obserwuje się również w miejscach wapnienia kości długich.

Przyczyną wystąpienia zmian zwyrodnieniowo-zniekształcających (*osteoarthritis*) jest nałożenie się działania negatywnych czynników pochodzenia biochemicznego i biomechanicznego. Zmiany patologiczne dotyczą głównie tkanek i mogą być wynikiem złamań, pęknięć czy zwichnięcia stawu, towarzyszą także dysplazjom i osteochondromom. Do głównych objawów należy degradacja chrząstki stawowej, subchondralne twarzenie kości oraz pojawienie się w płynie maziowym cech charakterystycznych dla procesu zapalnego (21). Proces powstawania choroby jest złożony i dotyczy zaburzenia naturalnej równowagi pomiędzy syntezą i degradacją składników pozakomórkowej macierzy chrząstki, za utrzymanie której odpowiedzialne są chondrocyty. Stany chorobowe wynikają zwykle z niezrównoważonej aktywności metaloproteinaz i związanych z nimi inhibitorów, na skutek działania których dochodzi do niszczenia struktury macierzy i degradacji proteoglikanów.

Diagnostyka *osteoarthritis* opiera się głównie na wykorzystaniu technik radiografii, które pozwalają na wykrywanie zaawansowanego stadium choroby. Nie znajdują natomiast zastosowania w przypadku detekcji zmian o niewielkim nasileniu. Artroskopia, rezonans magnetyczny czy ultrasonografia poprawiły czułość badań diagnostycznych, nie pozwoliły jednak na wykrywanie minimalnych zmian patologicznych oraz monitorowanie postępu choroby.

Najnowsze badania z zakresu *osteoarthritis* donoszą o możliwości wykorzystania markerów molekularnych do diagnozowania pacjentów podejrzanych o *osteoarthritis*. Wyróżnia się trzy grupy związków jako potencjalnych markerów *osteoarthritis*. Stromelizyna (MMP-3), kolagenaza (MMP-1), tkankowe inhibitory metaloproteinaz oraz interleukina 4 i 6 (IL-4, IL-6) należą do molekuł biorących udział w procesie degradacji chrząstki, natomiast siarczan keratanu, siarczan chondroityny, fragmenty agrekanu, glikoproteiny oraz niektóre oligomery białkowe są produktami jej rozkładu. Trzecią grupę potencjalnych markerów tworzą siarczan chondroityny, białka łącznikowe oraz kolagen X – substancje wytworzone na skutek odpowiedzi na zaistniały proces chorobowy (30).

Materiałem do badań diagnostycznych *osteoarthritis* może być osocze, płyn maziowy oraz mocz. Wykorzystanie osocza i moczu jako źródła informacji o toczącym się procesie chorobowym zostało zakwestio-

nowane. Stężenie markerów w tych płynach jest wypadkową przemian toczących się we wszystkich stawkach, co może prowadzić do zafałszowania wyników. Pomiary dokonywane z wykorzystaniem płynu maziowego wydają się najbardziej obiektywne i miarodajne.

Pomiar stężenia siarczanu keratanu oraz siarczanu chondroityny, jako pochodnych rozkładu chrząstki stawowej, może być wykorzystany w diagnostyce *osteoarthritis*. Zastosowanie w wykrywaniu tych GAG znajdującej techniki radioimmunologiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko epitopowi 3B3 siarczanu chondroityny, epitopowi 5D4 siarczanu keratanu oraz technika ELISA. Doświadczenia nie zawsze jednak potwierdzają korelację pomiędzy wystąpieniem *osteoarthritis* a wysokim stężeniem siarczanu keratanu zarówno u zwierząt, jak i u ludzi (2). Zmiany w metabolizmie tkanki objawiające się produkcją niewłaściwie ukształtowanych glikozoaminoglikanów, a zwłaszcza siarczanu keratanu, mogą stać się przyczyną wrażliwości stawów na czynniki zewnętrzne i wystąpienia choroby. W takim układzie stężenie siarczanu keratanu w płynie może nie ulec zmianie, a nawet się obniżyć. Lepszym markerem wydaje się siarczan chondroityny, którego stężenie wzrasta w większości przypadków naturalnie pojawiającego się i indukowanego *osteoarthritis* (12).

Dotychczasowe, często nieefektywne leczenie zmian zwyrodnieniowo-zniekształcających polegało wyłącznie na stosowaniu leków przeciwbólowych oraz niesteroidowych i steroidowych leków przeciwzapalnych, które wykazują szkodliwe działanie na metabolizm chrząstki stawowej. Dostawowe iniekcje kortykosteroidów znoszą przede wszystkim ból, co grozi nadmiernym przeciążaniem chorego stawu i dalszymi uszkodzeniami chrząstki stawowej. Obecnie stosuje się bardziej skuteczne sole sodowe kwasu hialuronowego posiadające właściwości przeciwbólowe i przeciwzapalne, zmniejszające wysięk stawowy oraz dodatnio wpływające na lepkość i sprężystość mazi stawowej. Sole sodowe HA wspomagają również odbudowę chrząstki stawowej, obniżając jednocześnie stężenie siarczanu keratanu, który jest markerem jej uszkodzeń (1).

Proteoglikany zbudowane z łańcuchów siarczanu chondroityny (agrekan, wersykan, neurokan, brewikan, fosfakan, neuroglikan C), siarczanu dermatanu, a także siarczanu heparanu (syndekan-2, syndekanu-3) biorą udział w formowaniu sieci neuronowej w rozwijających się mózgach ssaków. W obrębie neuronów CS tworzy śródkomórkowy szkielet, który umożliwia utrzymywanie stałego kształtu komórek nerwowych. Proteoglikany zawierające CS wpływają na takie procesy, jak: przyleganie komórkowe, proliferacja, różnicowanie, migracja neuronalna czy synaptogeneza.

Prawidłowe funkcjonowanie glikozoaminoglikanów wymaga sprawnego działania enzymów zaangażowanych zarówno w ich syntezę, jak i degradację. Nawet niewielkie zaburzenia ich aktywności mogą prowadzić

do różnego typu zmian chorobowych o charakterze przewlekłym, które mogą być przyczyną trwałego kalectwa. Ponadto wczesne zmiany, przebiegają na ogół bezobjawowo i mogą być trudne do uchwycenia za pomocą obecnie stosowanych metod. Badanie czynników regulujących procesy syntezy i degradacji glikozoaminoglikanów mają ogromne znaczenie dla poznania mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie zmian patologicznych, co w dalszej perspektywie może przyczynić się do rozwoju lepszych metod diagnostycznych i stworzyć w przyszłości podstawy do zastosowania nowych, bardziej skutecznych i swoistych metod terapeutycznych.

Piśmiennictwo

1. Amiel D., Toyoguchi T., Kobayashi K., Bowden K., Amiel M. E., Healey R. M.: Long-term effect of sodium hyaluronate (Hyalgan) on osteoarthritis progression in a rabbit model. *Osteoarthr. Cartilage* 2003, 11, 636-643.
2. Belcher C., Yaqub R., Fawthrop F., Bayliss M., Doherty M.: Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Ann. Rheum. Dis.* 1997, 56, 299-307.
3. Borawski J., Naumnik B., Mysliwiec M.: Hepatocyte growth factor: a possible mediator of heparin-induced osteoporosis? *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2003, 9, 171-172.
4. Brown E. L., Wooten R. M., Johnson B. J., Iozzo R. V., Smith A., Dolan M. C., Guo B. P., Weis J. J., Hook M.: Resistance to Lyme disease in decorin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 2001, 107, 845-852.
5. Chauvin K., Bratton C., Parkins C.: Healing large tympanic membrane perforations using hyaluronic acid, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1999, 121, 43-47.
6. Cywes C., Wessels M. R.: Group A Streptococcus tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature* 2001, 414, 648-652.
7. Echtermeyer F., Streit M., Wilcox-Adelman S., Saoncella S., Denhez F., Detmar M., Goetinck P.: Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J. Clin. Invest.* 2001, 107, R9-R14.
8. Funderburgh J. L.: Keratan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* 2002, 54, 187-194.
9. Grobe K., Ledin J., Ringvall M., Holmborn K., Forsberg E., Esko J. D., Kjellen L.: Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 19, 209-215.
10. Harmon B. G., Glisson J. R., Latimer K. S., Steffens W. L., Nunnally J. C.: Resistance of *Pasteurella multocida* A:3,4 to phagocytosis by turkey macrophages and heterophils. *Am. J. Vet. Res.* 1991, 52, 1507-1511.
11. Humphries D. E., Wong G. W., Friend D. S., Gurish M. F., Qiu W. T., Hung C., Sharpe A. H., Stevens R. L.: Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 1999, 400, 769-772.
12. Innes J. F., Sharif M., Barr A. R. S.: Changes in concentrations of biochemical markers of osteoarthritis following surgical repair of ruptured cranial cruciate ligaments in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1999, 60, 1164-1168.
13. Klaassen C. D., Boles J. W.: Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB J* 1997, 11, 404-418.
14. Kovanen P. T., Pentikainen M. O.: Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: a novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc. Med.* 1999, 9, 86-91.
15. Lewis S., Crossman M., Flannelly J., Belcher C., Doherty M., Bayliss M. T., Mason R. M.: Chondroitin sulphation patterns in synovial fluid in osteoarthritis subsets. *Ann. Rheum. Dis.* 1999, 58, 441-445.
16. Liu J., Thorp S. C.: Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. *Med. Res. Rev.* 2002, 22, 1-25.
17. Lohmander L. S.: Markers of cartilage metabolism in arthrosis. *Acta Orthop. Scand.* 1991, 62, 623-632.
18. Manna F., Dentini M., Desideri P., De Pita O., Mortilla E., Maras B.: Comparative chemical evaluation of two commercially available derivatives of hyaluronic acid (hylaform from rooster combs and restylane from streptococcus) used for soft tissue augmentation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 1999, 13, 183-192.
19. Michanetzis G., Katsala N., Missirlis Y.: Comparison of haemocompatibility improvement of four polymeric biomaterials by two heparinization techniques. *Biomaterials* 2003, 24, 677-688.
20. Mousa S. A., Fareed J.: Overview: from heparin to low molecular weight heparin: beyond anticoagulation. *Curr Opin Investig Drugs* 2001, 2, 1077-1080.
21. Myers S. L.: Synovial fluid markers in osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 1999, 25, 433-449.
22. Ninomiya T., Sugiura N., Tawada A., Sugimoto K., Watanabe H.: Molecular cloning and characterization of chondroitin polymerase from *Escherichia coli* strain K4. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 21567-21575.
23. Nizet V., Ohtake T., Lauth X., Trowbridge J., Rudisill J., Dorschner R. A., Pestonjama V., Piraino J., Huttner K., Gallo R. L.: Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 2001, 414, 454-457.
24. Orloff L. A., Glenn M. G., Domb A. J., Esclamado R. A.: Prevention of venous thrombosis in microvascular surgery by transmural release of heparin from a polyanhydride polymer. *Surgery* 1995, 117, 554-559.
25. Penc S. F., Pomahac B., Eriksson E., Detmar M., Gallo R. L.: Dermatan sulfate activates nuclear factor-kappaB and induces endothelial and circulating intercellular adhesion molecule-1. *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 1329-1335.
26. Penc S. F., Pomahac B., Winkler T., Dorschner R. A., Eriksson E., Gallo R. L.: Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J. Biol. Chem.* 1998, 263, 28116-28121.
27. Raats C. J., Van Den Born J., Berden J. H.: Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int.* 2000, 57, 385-400.
28. Rabenstein D. L.: Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat. Prod. Rep.* 2002, 19, 312-331.
29. Roberts J. A.: Tropism in bacterial infections: urinary tract infections. *J. Urol.* 1996, 156, 1552-1559.
30. Rorvik A. M., Grondahl M.: Markers of osteoarthritis: a review of the literature. *Vet. Surg.* 1995, 24, 255-262.

Adres autora: mgr inż. Joanna Zeyland, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań; e-mail: jzeyland@yahoo.com, jzeyland@gmail.com