

# Stężenie białka MGP w surowicy pacjentów w późnym stadium choroby zwyrodnieniowej stawów

## *Serum level matrix GLA protein (MGP) in end-stage osteoarthritis*

Kinga Lis

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, kierownik Katedry prof. dr hab. med. Grażyna Odrowąż-Sypniewska

**Słowa kluczowe:** MGP, chrząstka stawowa, choroba zwyrodnieniowa stawów.

**Key words:** MGP, articular cartilage, osteoarthritis.

### Streszczenie

Celem pracy była ocena stężenia białka MGP w surowicy osób chorych na idiopatyczną chorobę zwyrodnieniową stawów w późnej fazie choroby.

Grupę badaną stanowiło 12 osób chorych na idiopatyczną chorobę zwyrodnieniową stawów w jej końcowym stadium, a grupę kontrolną 14 osób zdrowych. W surowicy krwi żyłnej, pobranej w warunkach standardowych, oznaczono stężenie białka MGP. Badania laboratoryjne wykonano metodą immunoenzymatyczną ELISA.

Stężenie MGP w surowicy osób z chorobą zwyrodnieniową stawów było znacząco mniejsze niż w surowicy osób zdrowych. Pacjenci z obu grup byli w porównywalnym wieku. Poziom MGP w surowicy był niezależny od wieku – zarówno u osób chorych, jak i zdrowych. Zaobserwowano, że im dłużej pacjenci odczuwali dolegliwości bólowe, tym mniejsze było u nich stężenie MGP w surowicy. Słaba ujemna korelacja łączyła stężenie MGP w surowicy z czasem, jaki upłynął od pierwszych dolegliwości bólowych do endoprotezoplastyki chorego stawu. Analiza krzywej ROC wskazuje na bardzo dobre własności różnicujące białka MGP w przypadku późnego stadium choroby zwyrodnieniowej stawów.

Małe stężenie białka MGP w surowicy może stanowić przyczynę kalcyfikacji chrząstki stawowej w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów. Wydaje się, że pomiar stężenia MGP w surowicy ma dużą wartość w laboratoryjnej diagnostyce choroby zwyrodnieniowej stawów.

### Summary

Aim of the study was evaluation of level of MGP (matrix GLA protein) in serum end-stage osteoarthritis patients.

12 end-stage osteoarthritis patients and 14 healthy persons were included in the study. Serum level matrix GLA protein (MGP) was measured by ELISA technique.

MGP concentration in the serum osteoarthritis patients was lower than in the controls. Patients and healthy persons were of similar age. Serum MGP level was independent of age of osteoarthritis patients and healthy persons. Concentration of MGP in serum of osteoarthritis patients who had joint pain for a long time was lower than in the serum of osteoarthritis patients with shorter time of arthralgia. A weak negative correlation between time from beginning of joint ailment to total arthroplasty and matrix GLA protein level in serum was observed. The ROC curve suggests that serum MGP concentration is a very useful test for diagnosis of end-stage osteoarthritis.

Low concentration of MGP in serum may be the cause of articular cartilage calcification during osteoarthritis. Serum MGP level seems to be a useful biochemical marker for laboratory diagnosis of osteoarthritis.

---

### Adres do korespondencji:

dr med. Kinga Lis, Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel. +48 52 585 40 46, faks +48 52 585 36 03, e-mail: kzlis@gazeta.pl

**Praca wpłynęła:** 30.07.2007 r.

## Wstęp

Macierz zewnątrzkomórkowa stanowi 90% masy chrząstki, która w 65–80% jest zbudowana z wody, resztę stanowią: kolagen (10–30%), proteoglikany (5–10%), lipidy i niekolagenowe białka macierzy, w tym enzymy i białka strukturalne [1]. Rola wielu z nich nie została jednak dotychczas poznana [2]. Białka te pełnią prawdopodobnie istotną funkcję w utrzymaniu homeostazy chrząstki, ustalając i zachowując zależność między chondrocytami oraz wpływając na metabolizm macierzy zewnątrzkomórkowej. Prawdopodobnie regulują procesy tworzenia i degradacji tkanki chrząstki i utrzymują między nimi stan równowagi [1, 2].

Inną istotną częścią tej grupy białek jest MGP (*matrix Gla protein*) – białko małej cząsteczki o masie 8,5 kDa. Białko MGP zawiera w swojej cząsteczce znaczne ilości kwasu  $\gamma$ -karboksylglutaminowego [3], a jego synteza jest zależna od witaminy K [3, 4]. Obecność tego białka stwierdzono w niewąpniejącej chrząstce oraz mięśniach gładkich ścian naczyń tętniczych [5–8].

Białko to prawdopodobnie chroni macierz chrząstki przed zwapnieniem oraz reguluje różnicowanie się chondrocytów [9–11], pełni również funkcję inhibitorową wobec białka morfogenetycznego 2 (BMP-2), uważanego za główny czynnik o działaniu osteogennym [6, 12–16].

Tworzenie się ognisk zwapnienia w chrząstce stawowej stanowi jedną ze zmian morfologicznych charakterystycznych dla chondrokalcynozy oraz choroby zwyrodnieniowej stawów [17–21].

## Cel pracy

Celem pracy była ocena stężenia białka MGP w surowicy osób chorych na idiopatyczną chorobę zwyrodnieniową stawów w późnej fazie choroby.

## Materiał i metody

Grupę badaną stanowiło 12 osób chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów biodrowych lub kolanowych, w wieku  $66 \pm 7$  lat, w tym 9 kobiet i 3 mężczyzn. Osoby te były zakwalifikowane do wszczęcia całkowitej endoprotezy stawu z powodu zaawansowanych zmian zwyrodnieniowych.

Grupę kontrolną stanowiło 14 osób zdrowych, w wieku  $65 \pm 6$  lat, w tym 7 kobiet i 7 mężczyzn. U tych osób w badaniu ankietowym nie wykazano żadnych dolegliwości ze strony układu kostno-stawowego oraz chorób o podłożu zapalnym.

Badania laboratoryjne wykonano w surowicy krwi żyłnej pobranej w sposób standardowy do suchych, szklanych probówek zamkniętego systemu próżniowe-

go Vacutainer (Beton Dickinson). Po pobraniu wykrzepioną krew odwirowywano (10 min, 3000 obrotów/min) w celu uzyskania surowicy. Próbkę surowicy przechowywano zamrożone w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń.

W badanym materiale oznaczono stężenie białka MGP. Badania laboratoryjne przeprowadzono w jednej serii, metodą immunoenzymatyczną ELISA z zastosowaniem gotowego zestawu testowego Human MGP matrix GLA protein firmy Biomedica. Pomiar absorbancji i przeliczenie stężeń wykonano za pomocą czytnika mikroplitek ELISA Lab Systems Muliscan RC z oprogramowaniem GENESIS. Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono, wykorzystując test t-Studenta oraz test korelacji Pearsona. W celu oceny przydatności diagnostycznej oznaczania białka MGP wykreślono krzywą ROC i obliczono pole pod krzywą.

## Wyniki

Średni wiek chorych w schyłkowym stadium choroby zwyrodnieniowej stawów był porównywalny do średniego wieku osób zdrowych, zakwalifikowanych do grupy kontrolnej.

W żadnej z grup nie zaobserwowano znamiennej zależności poziomu MGP w surowicy od wieku osób badanych (grupa badana  $R=-0,1$ ; grupa kontrolna  $R=-0,2$ ).

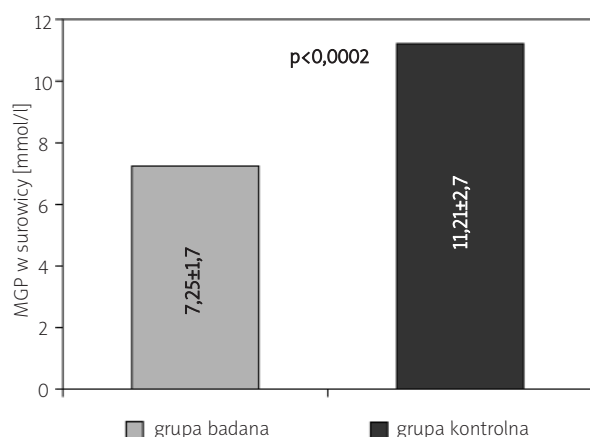
Stężenie MGP w surowicy osób chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów było znamienne mniejsze niż w surowicy osób zdrowych (ryc. 1.).

Średni czas odczuwania bólu przez osoby chore na chorobę zwyrodnieniową wynosił 7,5 roku i wahał się od 3 do 27 lat. Im dłużej pacjenci odczuwali dolegliwości bólowe, tym mniejsze było stężenie MGP w ich surowicy (ryc. 2.). Zaobserwowano słabą ujemną korelację między stężeniem MGP w surowicy a czasem, jaki upłynął od pojawienia się pierwszych dolegliwości bólowych do endoprotezoplastyki chorego stawu (ryc. 3.).

Pole pod krzywą ROC wynosiło 0,91, co wskazuje na bardzo dobre własności diagnostyczne oznaczania białka MGP w przypadku późnego stadium choroby zwyrodnieniowej stawów (ryc. 4.).

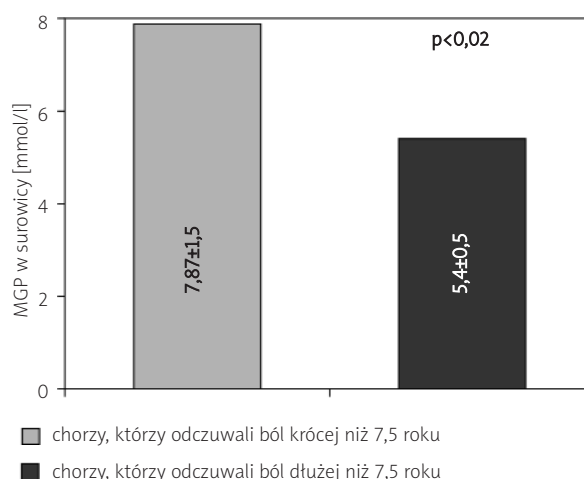
## Dyskusja

Białko MGP, zależne od witaminy K, jest jednym z białek strukturalnych macierzy chrząstki [3, 4]. Jest to proteina wydzielana przez proliferujące chondrocyty i komórki mięśni gładkich ścian naczyń krwionośnych [11, 22]. Funkcja MGP polega prawdopodobnie na ograniczeniu odkładania wapnia w tkankach miękkich oraz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej chrząstki [23, 24]. Zauważono, że MGP kumuluje się w tkankach głównie



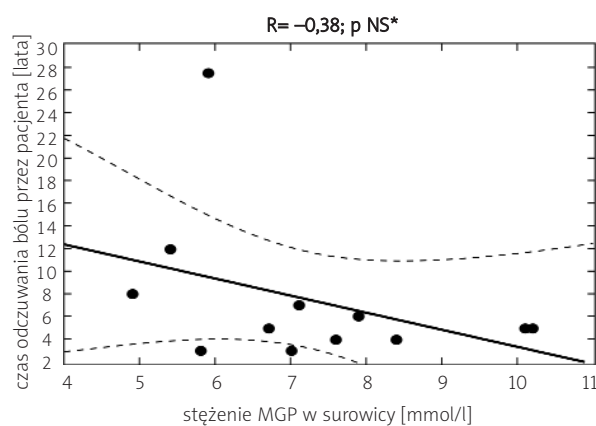
**Ryc. 1.** Porównanie stężenia białka MGP w surowicy osób chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów i osób zdrowych.

**Fig. 1.** Comparison of MGP level in serum osteoarthritis patients and healthy persons.



**Ryc. 2.** Porównanie stężenia białka MGP w surowicy osób chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów z uwzględnieniem czasu odczuwania dolegliwości bólowych.

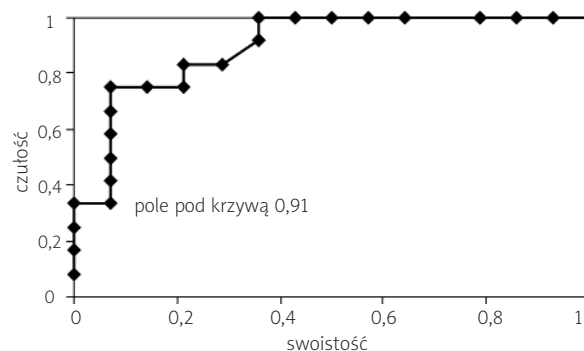
**Fig. 2.** Comparison of MGP level in serum osteoarthritis patients, with taking into consideration, time of feeling pain by patient.



\*NS – nieznamienne statystycznie

**Ryc. 3.** Zależność pomiędzy czasem odczuwania bólu przez pacjenta a stężeniem MGP w surowicy osób chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów.

**Fig. 3.** Correlations between time of feeling pain by patient and serum MGP level of osteoarthritis patients.



**Ryc. 4.** Krzywa ROC dla stężenia MGP w surowicy chorych w późnym stadium choroby zwyrodnieniowej stawów.

**Fig. 4.** Serum level MGP ROC curve of end-stage osteoarthritis patients.

na granicy rejonów uwapnienia i tkanki nieuwapnionej [8]. W dojrzałych chrząstkach MGP lokalizuje się w macierzy okotokomórkowej [25]. Jak zaobserwowali Yagami i wsp. [14] oraz Barone i wsp. [7], MGP nie tylko hamuje odkładanie wapnia w chrząstkach, ale reguluje również dojrzewanie chondrocytów i blokuje kostnienie śródchrzęstne rozwijającego się szkieletu. Niedobór

białka MGP podczas proliferacji i wzrostu chondrocytów indukuje ich apoptozę [6].

W przypadku fizjologicznego twardnienia szkieletu mineralizacja tkanek jest procesem prawidłowym [11]. O patologicznej kalcyfikacji tkanek mówi się wówczas, gdy ich uwapnienie staje się przyczyną rozwoju choroby [26]. Na nieprawidłową mineralizację tkanek znaczą-

cy wpływ może mieć m.in. długotrwałe utrzymujący się umiarkowany proces zapalny [27, 28].

Zachodząca z wiekiem nadmierna mineralizacja chrząstek stawowych stanowi istotną przyczynę rozwoju wielu chorób układu kostno-stawowego, wśród których wymienia się również chorobę zwyrodnieniową stawów [19–21, 29]. Jak wynika z przeprowadzonych badań, małe stężenie MGP w surowicy osób chorych w końcowej fazie choroby zwyrodnieniowej w stosunku do obserwowanego u osób zdrowych wydaje się potwierdzać udział niedoboru tego białka w rozwoju i progresji zmian zwyrodnieniowych. Zmniejszone stężenie MGP może być wynikiem ubytku macierzy chrząstki, co może z kolei skutkować jej nadmierną kalcyfikacją. Analiza krzywej ROC sugeruje, że oznaczanie białka MGP w surowicy może być niezwykle użyteczne w laboratoryjnej diagnostyce choroby zwyrodnieniowej stawów.

Postępującej degeneracji stawów nieodmiennie towarzyszy ból, który często jest pierwszą oznaką choroby. W niniejszej pracy zaobserwowano, że im więcej czasu upłynęło od pierwszych dolegliwości bólowych związanych z rozwijającymi się zmianami zwyrodnieniowymi, odczuwanych przez pacjentów, do operacji endoprotezoplastyki stawu, tym niższe było stężenie białka MGP w surowicy. Wydaje się więc, że małe stężenie MGP stanowi czynnik niekorzystny, predysponujący do szybszego postępu zmian degeneracyjnych. Nadmiernie zmineralizowana chrząstka traci swoją elastyczność i własności amortyzujące, przez co w niewłaściwy sposób przenosi obciążenia w stawie [1]. Na skutek niewystarczającej sprężystości tkanki chrzęstnej dochodzi również do zaburzeń jej odżywiania, co m.in. skutkuje obumieraniem chondrocytów [1].

U myszy ze szczepów charakteryzujących się niedoborem białka MGP obserwuje się nasiloną mineralizację chrząstki i uwapnienie ścian naczyń krwionośnych [22, 23, 30]. Wśród tych myszy zauważa się dużą śmiertelność młodych osobników z powodu znacznego uwapnienia tkanek miękkich i ścian naczyń tętniczych [31]. Maldonado i wsp. [32] sugerują, iż mutacje w obrębie genów kodujących MGP, skutkujące niedoborem syntezy tego białka, predysponują do odkładania związków wapnia w macierzy chrząstki i ścianach tętnic. Jak wynika z przeprowadzonych w niniejszej pracy badań, małe stężenie MGP w surowicy wydaje się czynnikiem sprzyjającym rozwojowi zmian zwyrodnieniowych w stawach.

## Podsumowanie

Znamienne zmniejszenie stężenia białka MGP w surowicy może stanowić przyczynę kalcyfikacji chrząstki stawowej w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów.

Wydaje się, że pomiar stężenia MGP w surowicy może mieć dużą przydatność w laboratoryjnej diagnostyce choroby zwyrodnieniowej stawów.

## Piśmiennictwo

- Hyc A, Osiecka-Iwan A, Józwiak J, Moskalewski S. Budowa i niektóre cechy biologiczne chrząstki stawowej. *Ortop Traum Reh* 2001; 3: 151-162.
- Neame PJ, Tapp H, Azizan A. Noncollagenous, nonproteoglycan macromolecules of cartilage. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1327-1340.
- Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 1985; 260: 14971-14975.
- Cranenburg EC, Schurgers LJ, Vermeer C. Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent. *Thromb Haemost* 2007; 98: 120-125.
- Boström K. Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am J Cardiol* 2001; 88: 20E-22E.
- Newman B, Gigout LI, Sudre L, et al. Coordinated expression of matrix GLA protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival. *J Cell Biol* 2001; 154: 659-666.
- Barone LM, Owen TA, Tassinari MS, et al. Developmental expression and hormonal regulation of the rat matrix Gla protein (MGP) gene in chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* 1991; 46: 351-365.
- Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, et al. Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 485-490.
- Nakatani S, Mano H, Ryanghyok IM, et al. Excess magnesium inhibits excess calcium-induced matrix-mineralization and production of matrix gla protein (MGP) by ATDC5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 1157-1162.
- Stheneur C, Dumontier MF, Guedes C, et al. Basic fibroblast growth factor as a selective inducer of matrix Gla protein gene expression in proliferative chondrocytes. *Biochem J* 2003; 369: 63-70.
- Luo G, Ducey P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386: 78-81.
- Corvol MT. The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2000; 67: 557-560.
- Hale JE, Fraser JD, Price PA. The identification of matrix GLA protein in cartilage. *J Biol Chem* 1988; 263: 5820-5824.
- Yagami K, Suh JY, Enomoto-Iwamoto M, et al. Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J Cell Biol* 1999; 147: 1097-1108.
- Zebboudj AF, Imura M, Boström K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002; 277: 4388-4394.
- Xue W, Wallin R, Olmsted-Davis EA, Borrás T. Matrix GLA protein function in human trabecular meshwork cells: inhibition of BMP2-induced calcification process. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 997-1007.

17. Buckwalter JA, Martin J. Choroba zwyrodnieniowa stawów. *Clinical Symposia* 1995; 47: 1-32.
18. Imhof H, Czerny C, Gahleitner A, et al. Koxarthrose. Hüftgelenk. *Radiologe* 2002; 42: 416-431.
19. Gordon GV, Villanueva T, Schumacher HR, Gohel V. Autopsy study correlating degree of osteoarthritis, synovitis and evidence of articular calcification. *J Rheumatol* 1984; 11: 681-686.
20. Doyle DV. Tissue calcification and inflammation in osteoarthritis. *J Pathol* 1982; 136: 199-216.
21. Ali SY. Apatite-type crystal deposition in arthritic cartilage. *Scan Electron Microsc* 1985; 4: 1555-1566.
22. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, et al. Characteristics and performance of an immunosorbent assay for human matrix Gla-protein. *Clin Chim Acta* 2005; 351: 131-138.
23. Gopalakrishnan R, Suttamanatwong S, Carlson AE, Franceschi RT. Role of matrix Gla protein in parathyroid hormone inhibition of osteoblast mineralization. *Cells Tissues Organs* 2005; 181: 166-175.
24. Shearer MJ. Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: 433-438.
25. Loeser R, Carlson CS, Tulli H, et al. Articular-cartilage matrix gamma-carboxyglutamic acid-containing protein. Characterization and immunolocalization. *Biochem J* 1992; 282: 1-6.
26. Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 2004; 165: 625-630.
27. Rutsch F, Terkeltaub R. Deficiencies of physiologic calcification inhibitors and low-grade inflammation in arterial calcification: lessons for cartilage calcification. *Joint Bone Spine* 2005; 72: 110-118.
28. Rutsch F, Terkeltaub R. Parallels between arterial and cartilage calcification: what understanding artery calcification can teach us about chondrocalcinosis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 302-310.
29. Karpouzas GA, Terkeltaub RA. New developments in the pathogenesis of articular cartilage calcification. *Curr Rheumatol Rep* 1999; 1: 121-127.
30. Luo G, Ducey P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386: 78-81.
31. El-Maadawy S, Kaartinen MT, Schinke T, et al. Cartilage formation and calcification in arteries of mice lacking matrix Gla protein. *Connect Tissue Res* 2003; 44: 272-278.
32. Maldonado I, Reginato AM, Reginato AJ. Familial calcium crystal diseases: what have we learned? *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 225-233.