

Biochemie kosti

Jana Novotná

Obsah přednášky

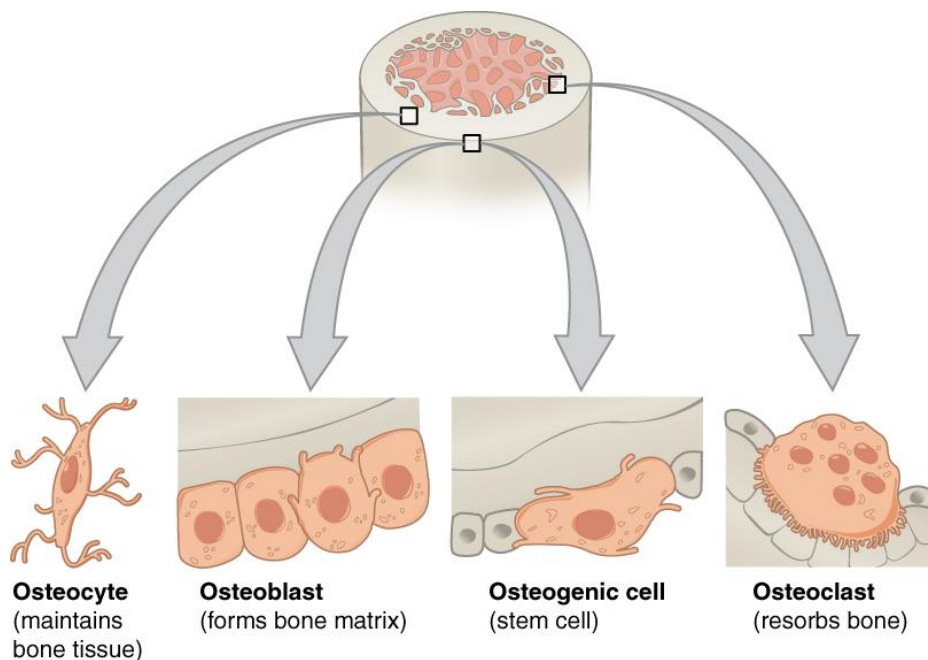
- Složení kosti – kostní buňky, extracelulární matrix, anorganická matrix (minerál).
- Tvorba kosti v růstové destičce, matrixové váčky (vezikuly), tvorba minerálu, enzymy a další struktury účastnící se procesu mineralizace.
- Kostní remodelace jako aktivní a dynamický proces, rovnováha mezi kostní tvorbou a odbouráváním.
- Hormony regulující kostní metabolismus.
- Markery kostního metabolismu.

Kostní matrix

- Kostní tkáň poměrně tvrdý, ale lehký kompozitní materiál obsahující minerál (hydroxyapatit) a kolagen, elastickou bílkovinu, která zvyšuje odolnost proti frakturám.
- **Organická matrix** ~25%
 - 85 – 90% kolagen typu I, stopové množství kolagenu III a V a FACIT kolageny (v určité stadiu tvorby kosti, pomoc při tvorbě fibril),
 - kostní proteoglykany,
 - glykosilované proteiny (alkalická fosfatasa),
 - adhesivní glykoproteiny,
 - gama-karboxylované (gla) proteiny,
 - sérový albumin a α_2 -HS-glykoprotein – vazba na hydroxyapatit,
 - růstové faktory
- **Anorganická matrix** ~65%, převážně hydroxyapatit - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, amorfnní fosforečnan vápenatý - $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, ionty - CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+}
- **Voda** 10%

Kostní buňky

- osteocyty
- osteoblasty
- nediferencované kmenové buňky
- buňky lemující kost
- osteoklasty



Iontové složení kostního minerálu (mmol/g suché kostní tkáň bez tuku)

Kationty	množství	Anionty	množství
Ca ²⁺	6.66	PO ³⁻	4.02
Mg ²⁺	0.18	CO ₃ ²⁻	0.79
Na ⁺	0.32	Citrate ³⁻	0.05
K ⁺	0.02	Cl ⁻	0.02

Funkce kosti

- Mechanická funkce
 - ochrana vnitřních orgánů (lebeční kosti, žebra)
 - podpůrná funkce – tělesný rámec těla
 - pohyb - pákový systém pro kosterní svaly, šlachy, vazy, klouby
 - šíření zvuku – sluchová funkce
- Syntetická funkce
 - kostní dřeň produkce krevních buněk

Funkce kosti

- Metabolická funkce
 - zásobárna důležitých minerálů (vápník, fosfáty, hořčík)
 - zdroj důležitých růstových faktorů (ILF, BMP, TGF)
 - zdroj mastných kyselin – tuk kostní dřeně
 - udržení acidobazické rovnováhy – regulace pH krve uvolňováním alkalických solí
 - detoxifikace – ukládání těžkých kovů a cizorodých látek
 - Endokrinní funkce – *FGF-23* reguluje fosfátový metabolismus, snižuje vstřebávání a zvyšuje vylučování fosfátů ledvinami, *osteokalcin* přispívá k regulaci hladiny glukosy v krvi a ukládání tuku do tukové tkáně (zvyšování sekrece inzulinu ovlivněním beta buněk pankreatu, uvolnění adiponektinu buňkami tukové tkáně → zvýšení senzitivity k inzulinu)

Funkce kosti

Optimální orientace kolagenních fibril → tlak a tah působící na kost.

Dědičné abnormality postihující kolagen – osteogenesis imperfecta:

- záměna některých aminokyselin v kolagenu typu I.
- zvýšená lomivost kostí.

Minerální složka je mezi fibrilami kolagenu uložena tak, aby byla zachována mechanická stabilita kosti.

Uspořádání kolagenních fibril závisí na věku jedince.

Kostní buňky

Osteocyty – 90% všech kostních buněk

- nejsou synteticky aktivní, podílejí se však na obměně minerálů, účastní se remodelace při poškozeních (únavové zlomeniny)
- kontrola pohybu iontů dovnitř kosti a ven.

Osteoblasty – produkují základní kostní hmotu

- vysoká proteosyntetická aktivita.

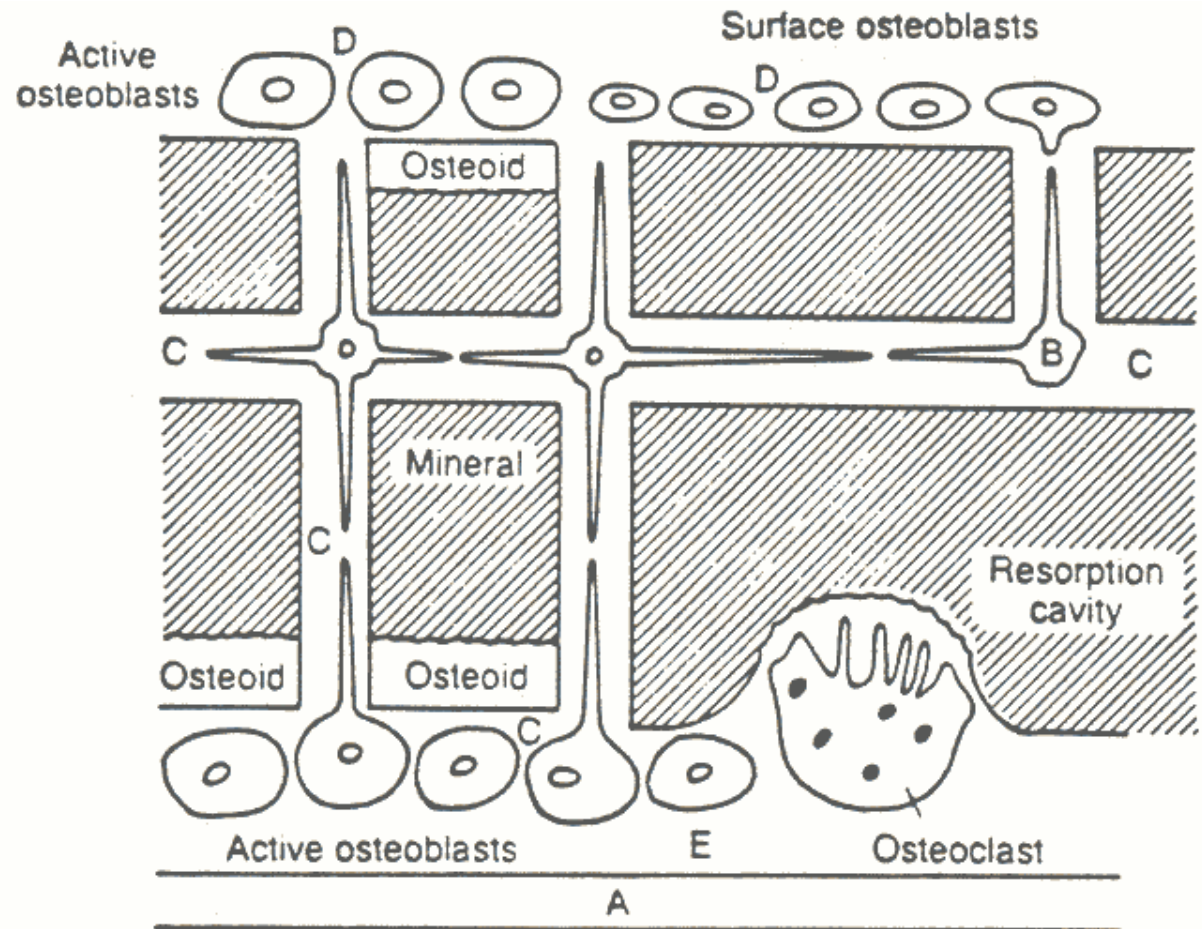
Buňky lemuující kost – pokrývají kost, která je v klidové fázi ve vrstvě 1 – 2 μm , podlouhlý a plochý tvar

Osteoklasty - buňky odbourávající kostní tkáň

- obsahují četné lysosomy s proteolytickými enzymy (kolagenasu, želatinasy, katepsiny, glykosidasu, sulfatasu, anorganickou pyrofosfatasu, izoenzym kyselý fosfatasy).

Membrána obsahuje protonovou pumpu – snížení pH7 \rightarrow pH4

Schéma fyziologické jednotky kostní tkáně:



- A - cévní prostor
B – osteocyt
C – kostní kanálek
D - nexus mezi
sousedními buňkami
E – pojivová tkáň

Porovnání koncentrací elektrolytů (mmol/l) mezi systémovou ECT (plasmou) a kostní ECT

	Ca	Mg	K	Na	P _i	Cl
Plasma	1.5	0.7	4	140	1.8	100
Kostní tekutina	0.48	0.4	25	125	1.8	130

Kostní membránu, která udržuje stálost koncentrace elektrolytů v kostní ECT, tvoří buňky lemující kost.

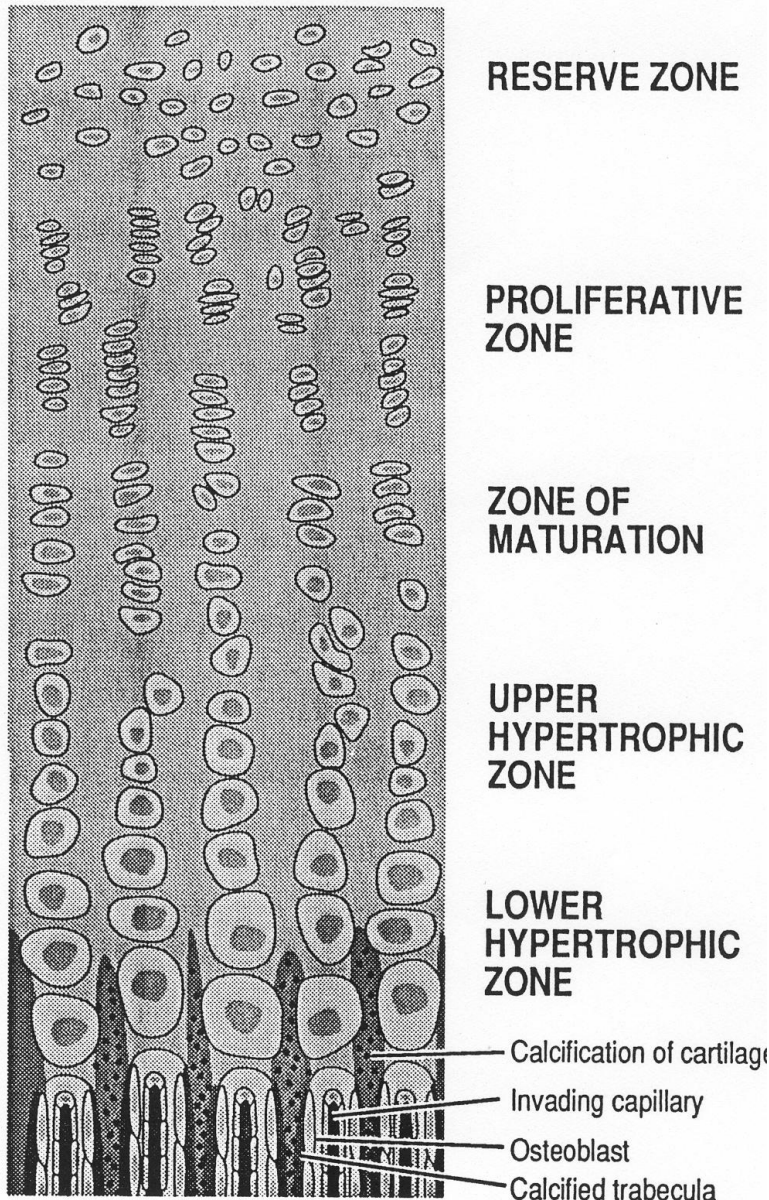
Fáze kostní tvorby

- tvorba kosti a mineralizace (embryonální vývoj).
- růst kostí.
- udržování kostní tkáně (remodelace, hojení).

Mechanismus tvorby kosti:

1. vznik kosti z chrupavky – enchondrální osifikace.
2. intramembránová osifikace – ploché kosti (embryonální vývoj).
3. apoziční tvorba – periostální rozšiřování kosti během modelace a remodelace.

Růstová destička



Vertikální sloupce chondrocytů v různém stádiu buněčného cyklu. Chondrocyty jsou ploché a neaktivní. Vznikají z nich dceřiné buňky proliferativní zóny.

Chondrocyty začínají proliferovat.

Chondrocyty dozrávají, produkují *matrixové vezikuly* (místo kalcifikace).

Chondrocyty se začínají zvětšovat, syntetizují *kolagen typu X* a *alkalickou fosfatasu*. Matrixové vesikuly jsou místem, kde vznikají *první krystalky minerálů*.

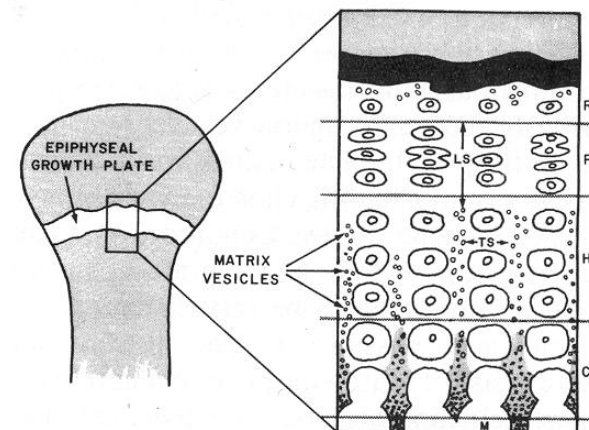
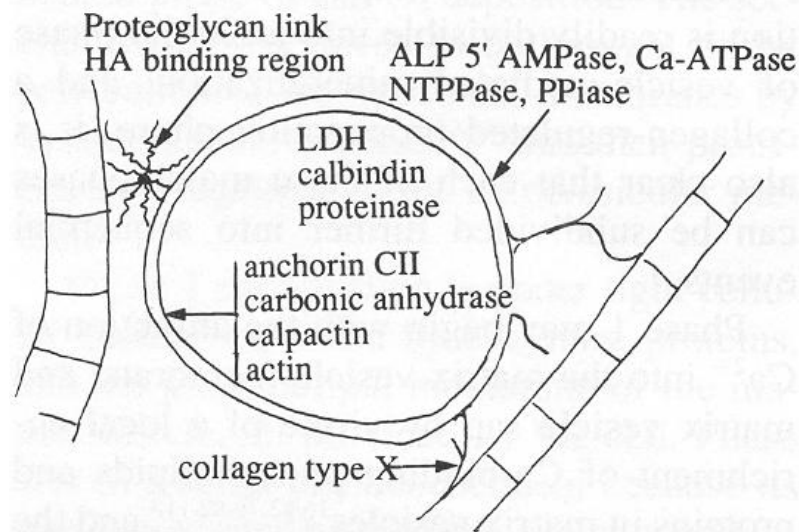
Apoptotické chondrocyty degenerují. Mineralizace pokračuje, do zóny pronikají kapiláry a z kostní dřeně osteoblasty. Osteoblasty syntetizují kostní organickou extracelulární matrix.

Matrixové vezikuly

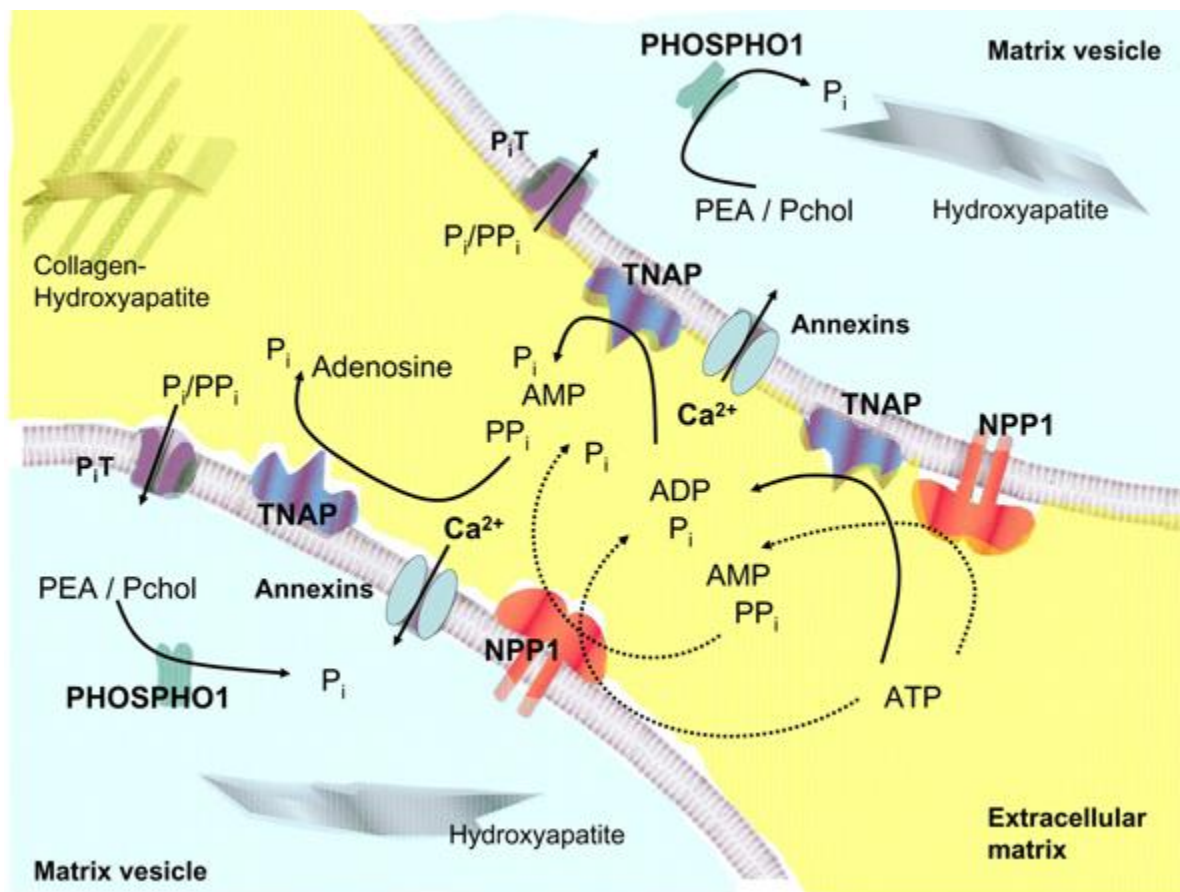
Matrixové vesikuly mezi dvěma fibrilami **kolagenu typu II**. Ke kolagenu jsou vázány proteoglykany s kyselinou hyaluronovou (HA).

V membráně vázané enzymy **fosfatasy** – fosfoproteinfosfatasa, alkalická fosfatasa (ALP), adenosinmonofosfoesterasa, Ca^{2+} - ATPasa, nukleosidtrifosfatasa, nukleotid pyrofosfatasa diesterasa (NPP), anorganická pyrofosfatasa (PPiase) (uvolnění enzymů z vazby na membránu zastaví kalcifikaci).

Uvnitř vezikulu jsou další enzymy a proteiny podporující mineralizaci.



Lokalizace růstové destičky



PHOSPHO1 – fosfoprotein fosfatasa1; P_iT – P_i transporter; PEA – fosfoetanolamin; Pcho – fosfocholin; TNAP – tkáňově nespecifická alkalická fosfatasa; NPP1 – PC-1/nukleotid pyrofosfatasa fosfodiesterasa

Enzymy matrixových vezikulů, kanály a transportéry

- *Tkáňově nespecifická alkalická fosfatasa* (TNAP) – hydrolýza esterů kyseliny fosforečné, tvorba P_i , hydrolýza PP_i
 - Nedostatek → hypofosfatasie (perinatální, dětská, dospělá hypofosfatasie, odontohypofosfatasie) klinická závažnost – kompletní nedostatek kostní mineralizace až po spontánní fraktury, ztráta deciduálních zubů.
- *Nukleotid pyrofosfatasa/fosfodiesterasa* (NPP1 patří do rodiny alkalických fosfatas) – hydrolýza diesterů kyseliny fosforečné na monoestery ($ATP \rightarrow AMP + PP_i$, $ADP \rightarrow adensin + PP_i$). Regulace tvorby minerálu, inhibice precipitace hydroxyapatitu zvýšenou koncentrací PP_i .
 - Neostatek – vznik spontánní kalcifikace měkkých tkání, včetně cévní stěny

Enzymy matrixových vezikulů, kanály a transportéry

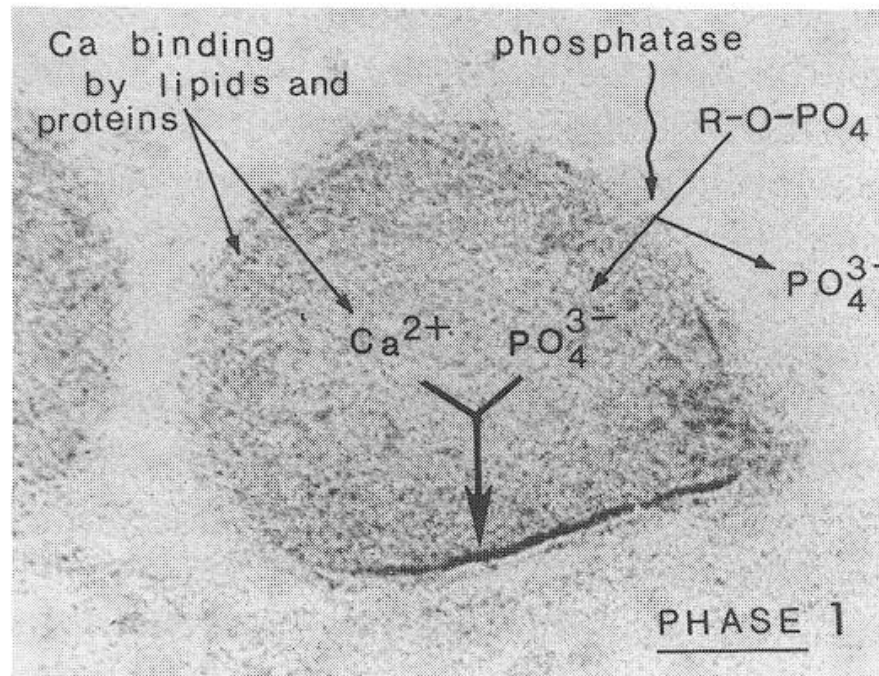
- *Fosfoproteinfosfatasa1* (PHOSPHO1) – tvorba P_i z fosfocholinu a fosfoetanolaminu
- *Anexiny* - Ca^{2+} iontové kanály v membráně matrixových vezikulů. Annexin V interakce a vazba na kolagen II a X stimuluje kanál k aktivitě, tok Ca^{2+} do vezikulů.
- *Transportér anorganického fosfátu* (P_iT) – Na^+ dependentní symport
- *Karboanhydrasa* (karbonáthydratasa) - reguluje pH uvnitř vezikulu, odstraňuje protony vznikající jako vedlejší produkt tvorby hydroxyapatitu.

Kalcifikace je kontrolovaný proces
regulovaný enzymy, proteiny a
fosfolipidy membrány

Biologie matrixových vezikulů

Fáze 1

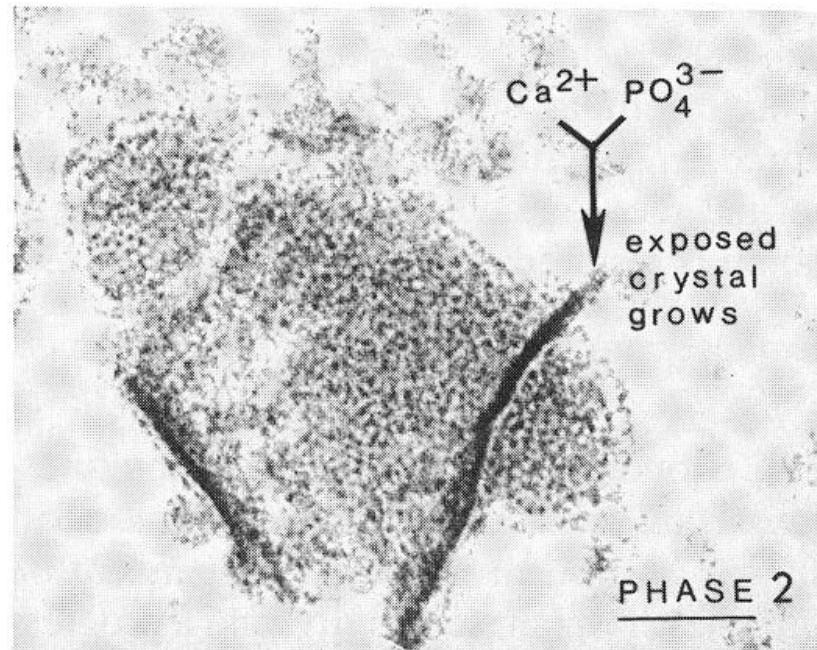
1. Ca^{2+} jsou přitahovány dovnitř vezikulu (Ca-vázajícími fosfolipidy a Ca^{2+} kanály), fosfatasy (alkalická fosfatasa, pyrofosfatasa, adenosintrifosfatasa) hydrolyzují estery kyseliny fosforečné, zvýšení lokální koncentrace PO_4^{3-} v okolí membrány
2. Akumulace PO_4^{3-} (aktivita alkalické fosfatasy).
3. Precipitace fosfátů kalcia.



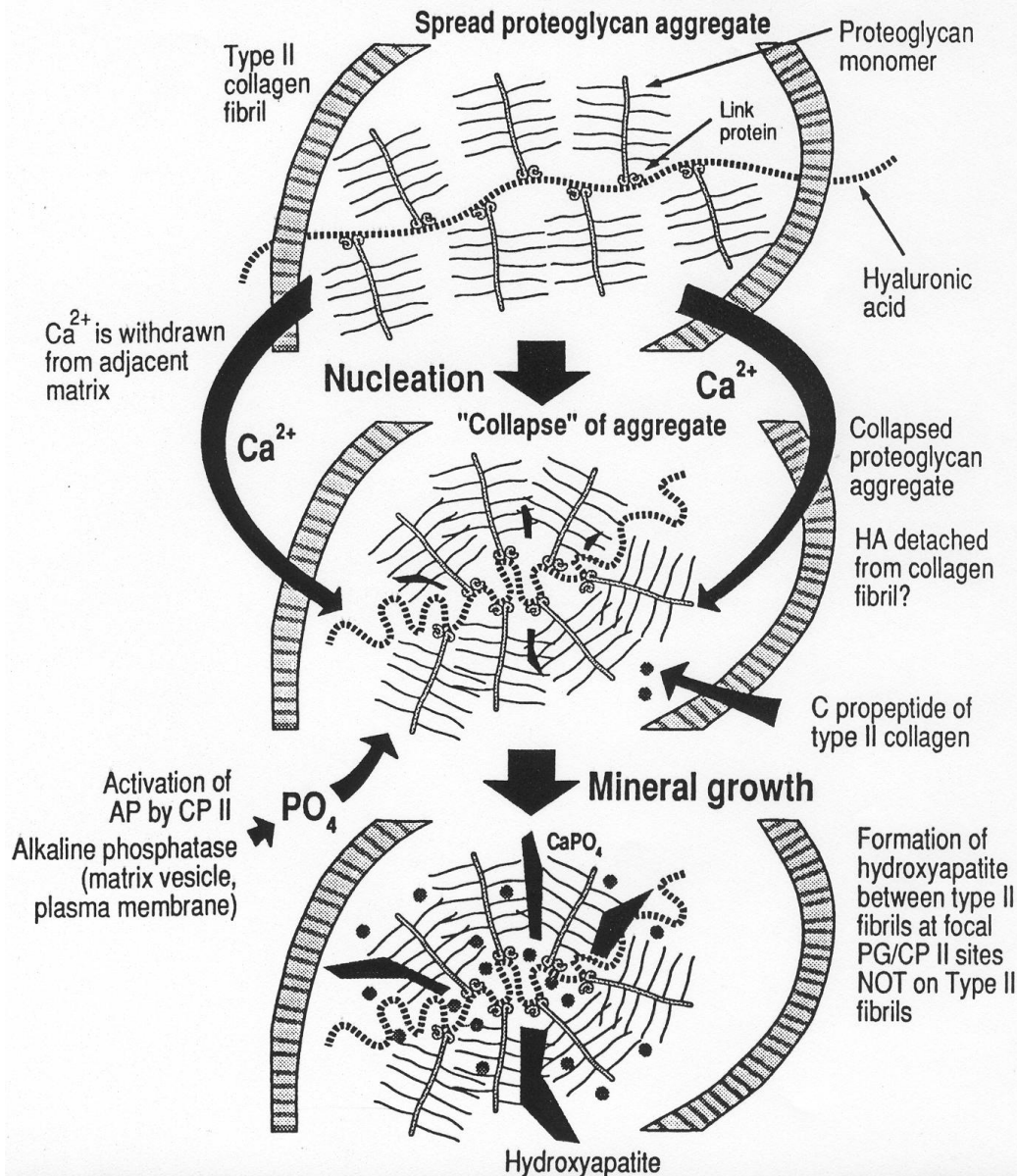
Biologie matrixových vezikulů

Fáze 2

4. Membrána matrixových vezikulů se rozruší (hydrolytické štěpení fosfolipasou a proteinasami).
5. Tvorba a růst krystalů hydroxyapatitu je zde samovolný proces.



MATRIX CHANGES IN HYPERTROPHIC CARTILAGE



Matrix hypertrofické části chrupavky obsahuje typické proteoglykany chrupavky a kolagen typu II.

Během nukleační fáze se matrix smršťuje a proteoglykany agregují. Ca^{2+} jsou z přilehlé matrix přitahovány do hypertrofické chrupavky. Chondrocyty a matrixové vesikuly produkují alkalickou fosfatasu (vznik volného fosfátu).

Pokračování mineralizace.

Složky nezbytné pro kalcifikaci

Ca²⁺ vážou:

- C-propeptid kolagenu typu II (silná afinita k hydroxyapatitu) v růstové destičce.
- kolagen typu I v kostní tkáni
- fosfoproteiny

Proces kalcifikace

- může probíhat pouze za přísunu kyslíku, minerálů a živin z kapilár,
- v rovnováze musí být – růst, hypertrofie, remodelace matrix a její kontrolovaná resorpce a kalcifikace.

Kalcifikace vyžaduje: 24,25(OH)vitamin D₃ a 1,25(OH) vitamin D₃, růstový hormon, hormony štítné žlázy, PTH, růstové faktory, cytokiny.

Fáze enchondrální osifikace

1. hypertrofie chondrocytů
2. kalcifikace matrix chrupavky
3. prorůstání krevních kapilár
4. diferenciací osteoblastů a osteoklastů
5. tvorba osteoidu
6. kalcifikace

Fáze přestavby kosti

1. resorpce
2. syntéza a sekrece organické kostní matrix
3. kalcifikace nově vytvořených kostních lamel

Kostní resorpce a tvorba jsou neodělitelné procesy

Osteoblasty a osteoklasty tvoří strukturu – základní multicelulární jednotku (basic multicellular unit – **BMU**).

Osteoklasty zodpovídají za kostní resorpci

Protonová pumpa

pH 7 → pH 4

Osteoblasty zodpovídají za tvorbu organické matrix

Lysosomální enzymy osteoklastů

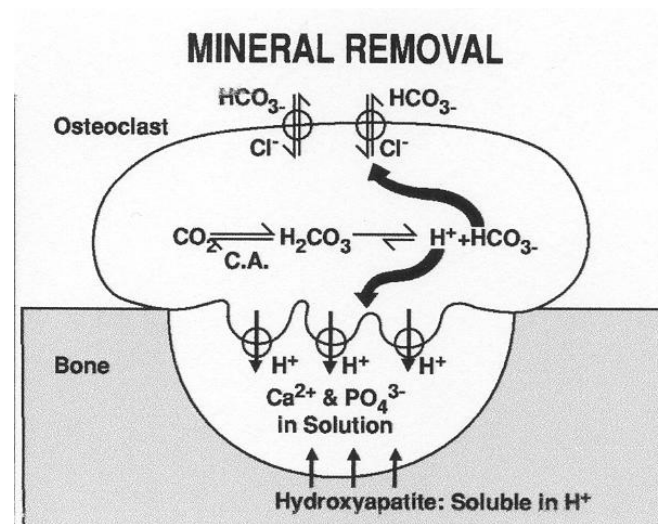
kyselá fosfatasa

katepsiny

glykosidasa

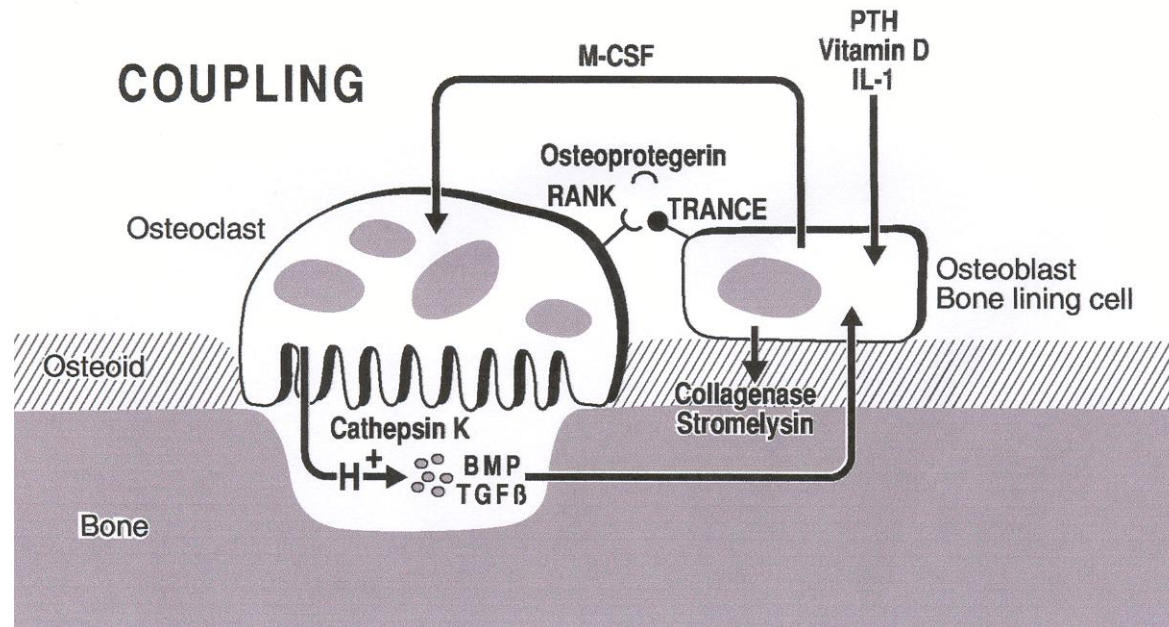
sulfatasa

kolagenáza

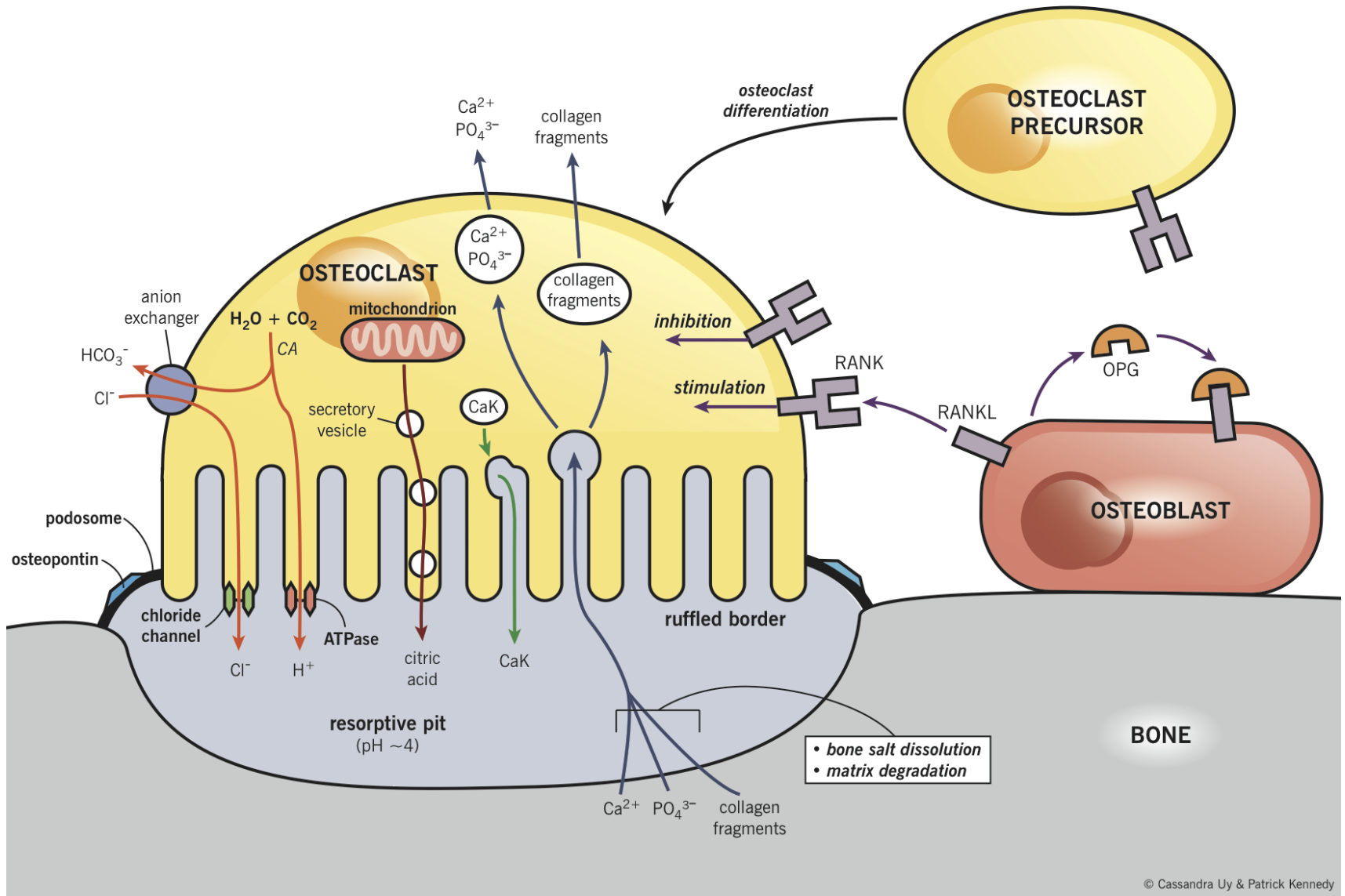


Spřažení činnosti osteoblastů a osteoklastů

Resorpce kosti činností osteoklastů a tvorba nové kostní tkáně osteoblasty je koordinovaný postupný proces



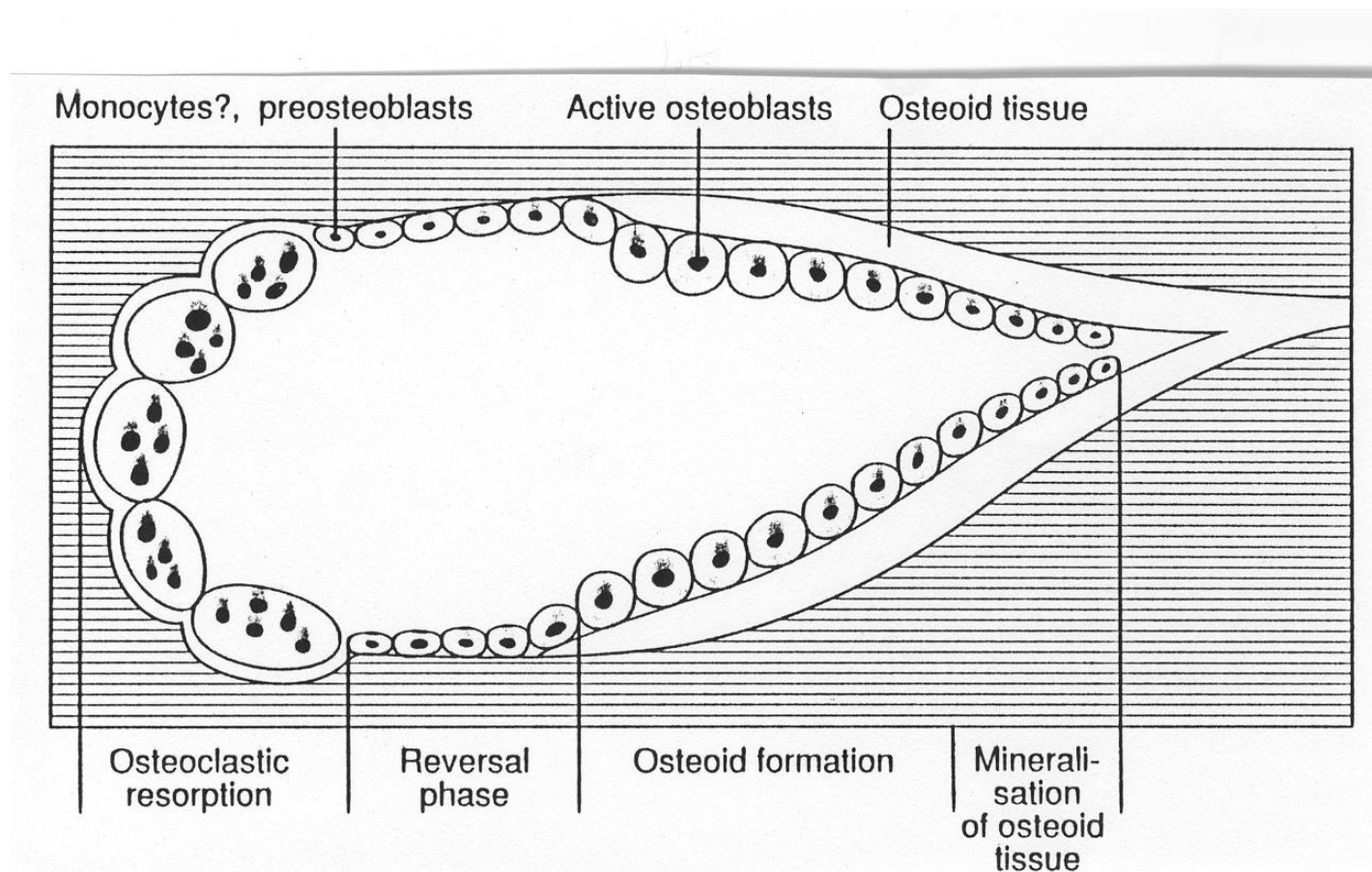
U zdravých mladých jedinců je kostní resorpce a tvorba nové kostní tkáně v **rovnováze**, takže kostní hmota zůstává konstantní. Patologický stav vzniká tehdy, když je resorpce a tvorba kosti v **nerovnováze**.



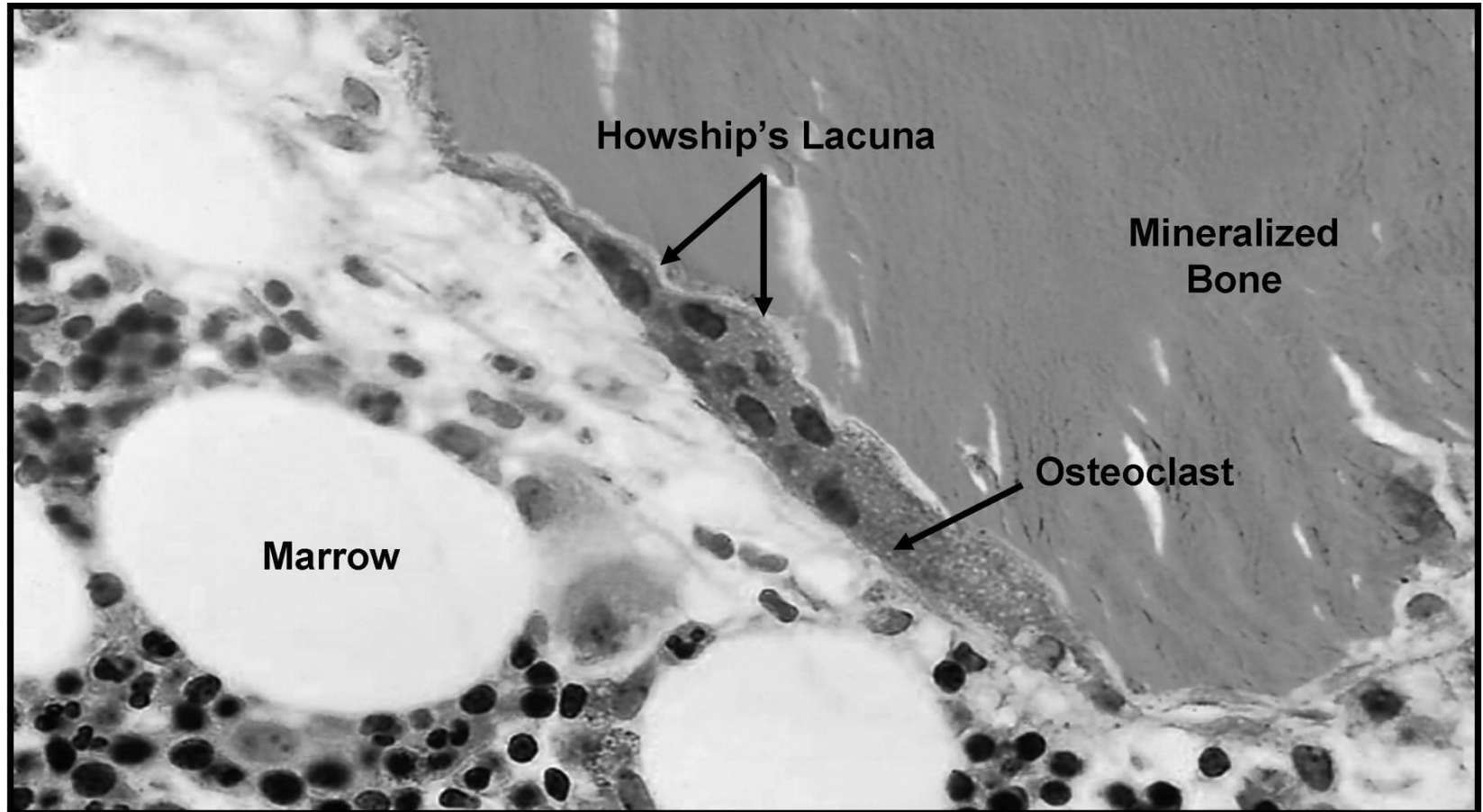
© Cassandra Uy & Patrick Kennedy

RANK = receptor aktivátor nukleárního faktoru κ B, RANKL = RANK ligand, OPG = osteoprotegerin

Resorpce a tvorba kosti v základní multiceulární jednotce (basic multicellular unit – BMU).

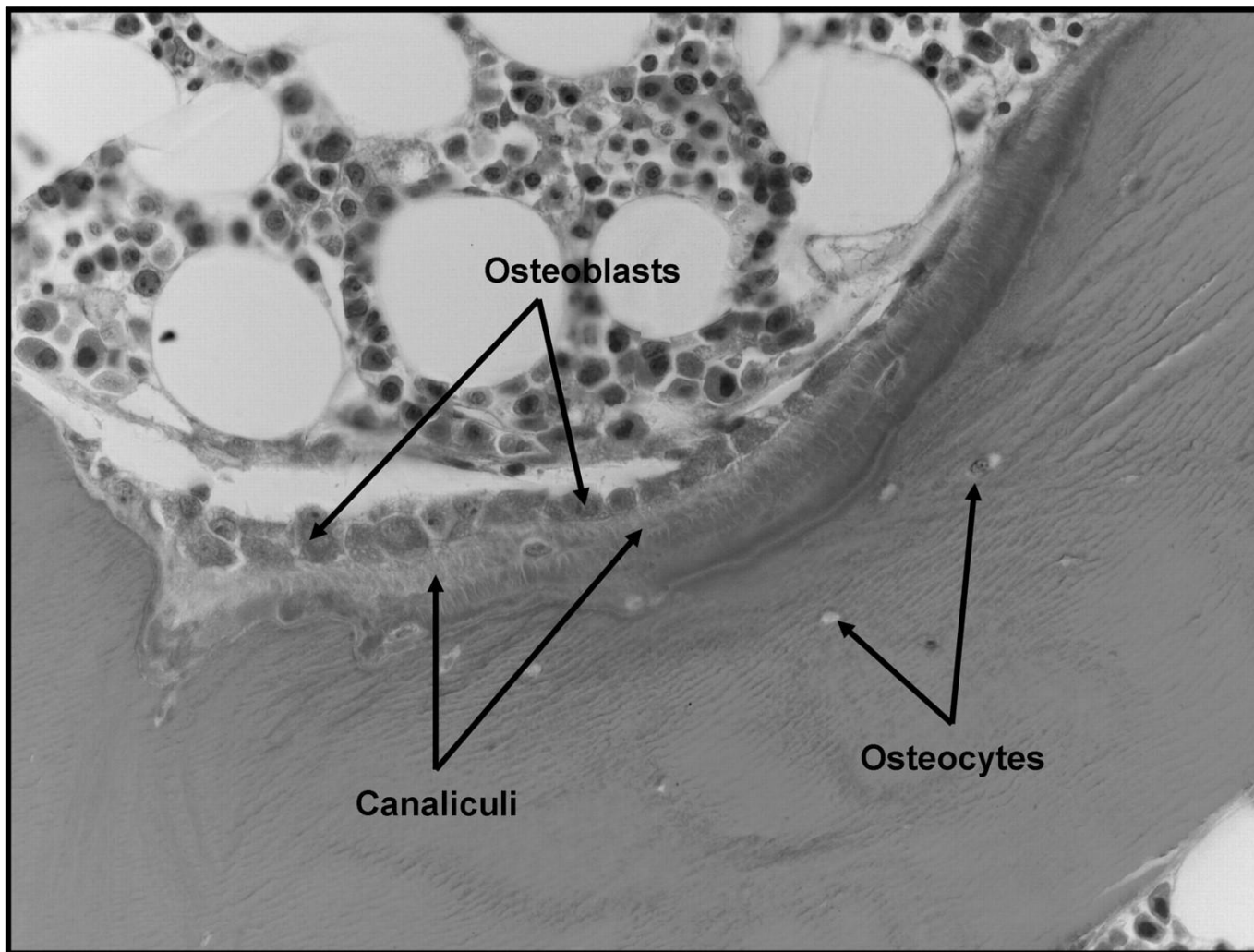


Multinucleated osteoclasts resorb bone to form resorption pits known as Howship's lacunae.



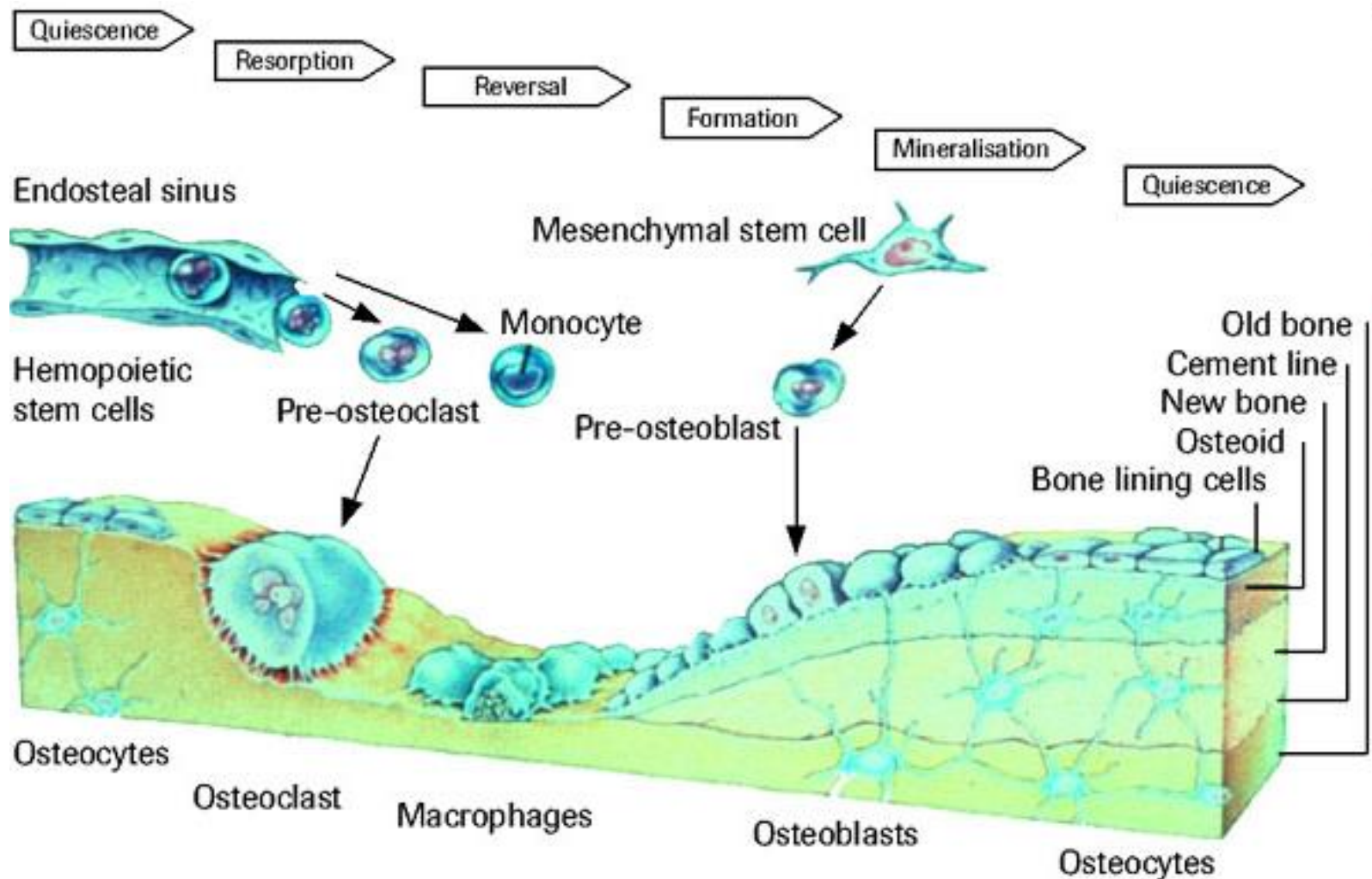
Clarke B CJASN 2008;3:S131-S139

Osteoblasts synthesize proteinaceous matrix, composed mostly of type I collagen, to fill in resorption pits.

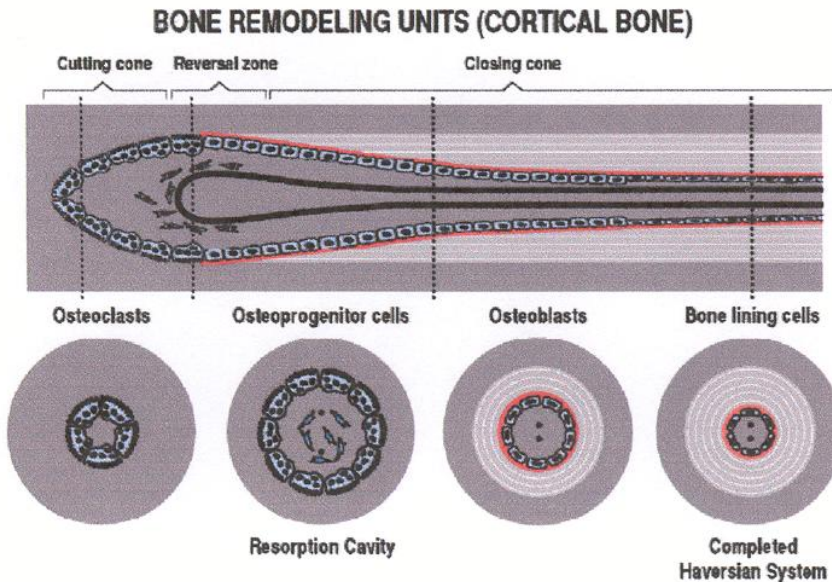


Clarke B CJASN 2008;3:S131-S139

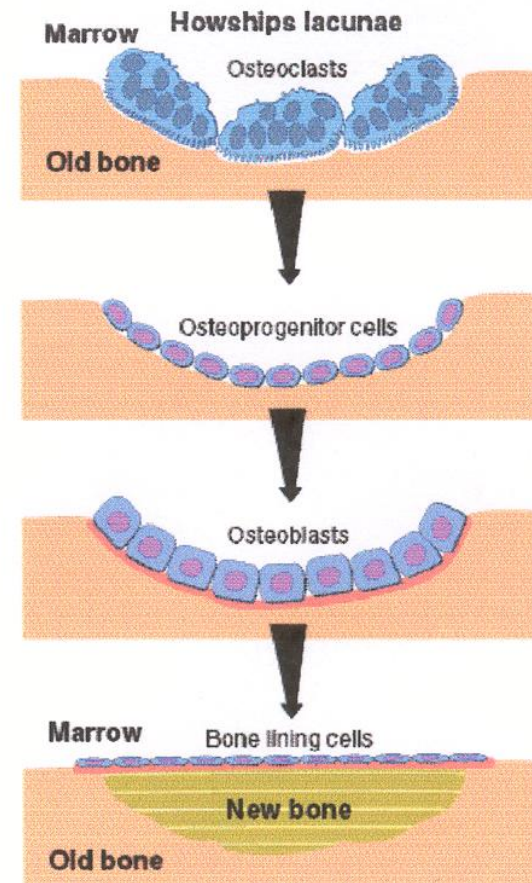
Resorpce a tvorba kosti v základní multiceulární jednotce (basic multicellular unit – BMU).



Resorpce a tvorba kosti v základní multicelulární jednotce (basic multicellular unit – BMU).



BONE REMODELING (Trabecular Bone)



Složky organické matrix kosti

- *Kolagen* - typ I, stopové množství typů III a V (regulace průměru fibril).
- *Malé proteoglykany* – agrekan, dekorin, biglykan a kyselina hyaluronová.
- *Kostní glykoproteiny* – kostní sialoprotein (zahájení mineralizace), osteonektin (regulace průměru fibril kolagenu), osteopontin (inhibice mineralizace a kostní remodelace).
- *Adhezivní glykoproteiny* – fibronektin, vitronektin, proteiny obsahující γ -karboxyglutamovou kyselinu, Gla-proteiny (inhibice mineralizace), fibrilin (regulace tvorby elastických vláken), osteokalcin (regulace osteoklastů, inhibice mineralizace).
- *Růstové faktory*

Hormony regulující kostní metabolismus

Systémové hormony metabolismu vápníku:

(Normální fyziologická hodnota Ca^{2+} je 8.5 – 11.5 mg/100 ml nebo 2.1 – 2.9 mmol/l)

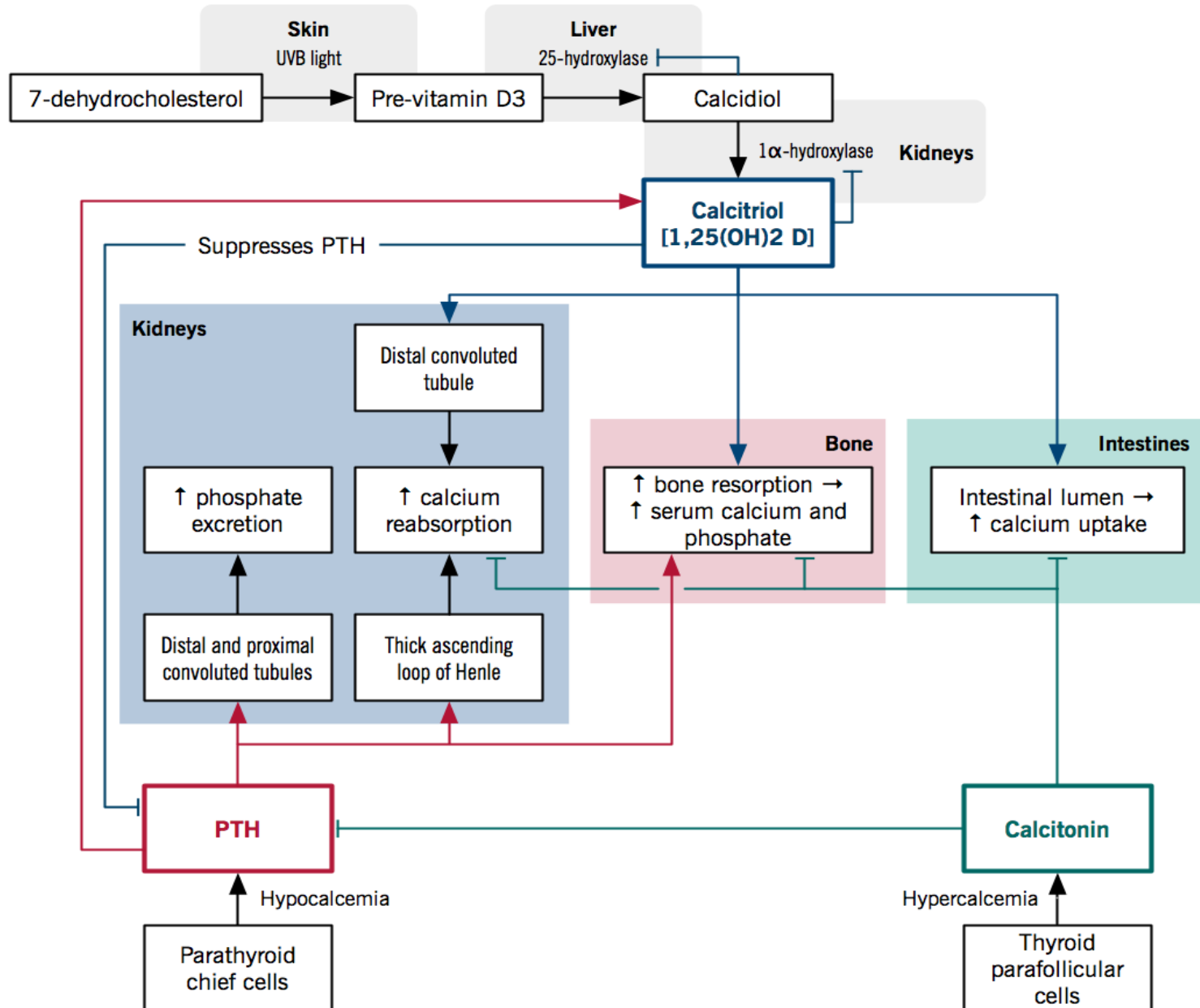
PTH – kostní resorpce - stimuluje transformaci monocytů na osteoklasty.

kalcitonin – kostní tvorba – inhibice transformace monocytů na osteoklasty.

1,25-dihydroxycholecalciferol ($1,25\text{-(OH)}_2$ vitamin D3) – podpora kostní tvorby (aktivace osteoblastů k syntéze kolagenu, podporuje mineralizaci).

Calcium homeostasis

Ashu Jain and Sultan Chaudhry



Parathormon (PTH) a PTH related peptid

- Peptidový hormon (84 aminokyselin) – zvyšuje kalcémie
- Uvolnění PTH za stavu snížení sérového Ca^{2+} → se přes sníženou vazbu na receptory pro vápník v příštítných těliscích- calcium sensing receptors (**CaSR**)
- zvýšená hladina vitaminu D snižuje PTH sekreci
- vysoká hladina fosfátů vylučování PTH také spouští → snížením sérového vápníku a vitaminu D.
- Hlavní účinek PTH zprostředkují **ledviny** a **kost**
- **ledviny:**
 - zvýšené zpětné vychytávání vápníku, zvýšené vylučování fosfátů,
 - stimulace tvorby vitaminu D: *stimuluje hydroxylaci* vitaminu D → rychlá aktivace transkripce 1 α -hydroxylasy v proximálním tubulu
- **kost:**
 - stimuluje kostní odbourávání: zvyšuje aktivitu osteoklastů přes *upregulaci RANKL*
 - nepřímo stimuluje kostní tvorbu – přes autokrinní a parakrinní signalizací IGF-1, FGF-2 a amfiregulin osteoblasty.

Kalcitonin

- Peptidový hormon 32 aminokyselin, parafolikulární tělíska štítné žlázy.
- Produkci stimuluje zvýšená hladina sérového kalcia, opačný efekt než PTH.
- Inhibice kostního odbourávání
- Snížení hladiny Ca třemi způsoby:
 1. přímá inhibice osteoklastů a kostní resorpce (zvýšení cAMP, zvýšení vápníku v cytosolu vede ke kontrakci buněčných membrán osteoklastů, tento efekt je přechodný)
 2. inhibice vstřebávání vápníku ve střevě
 3. inhibice zpětného vychytávání vápníku v ledvinách

Vitamin D

Ergokalciferol (**vitamin D2**) a *cholecalciferol* (**vitamin D3**) – potrava, rostlinné a živočišné zdroje

1,25 (OH)₂D₃ udržuje kalcemii:

1. zvýšeným vychytáváním vápníku z lumen střeva, zvyšuje absorpci fosfátu ze střeva
2. zpětným vychytáváním vápníku v distálních ledvinových tubulech, zvyšuje účinky PTH
3. stimulací osteoblastů produkovat RANKL → aktivace osteoclastů odbourávat kost a zvyšovat hladinu Ca v krvi.

Další systémové hormony:

Glukokortikoidy – inhibují kostní tvorbu (inhibice diferenciace osteoblastů).

Růstový hormon – stimuluje kostní tvorbu přes lokální růstové faktory, somatomediny (IGF-1 a IGF-2).

Insulin – zvyšuje syntetickou aktivitu osteoblastů.

Hormony štítné žlázy – stimulují osteoklasty, aktivují kostní remodelaci.

Estrogeny – inhibují kostní resorpci, inhibují aktivitu osteoklastů přes specifické lokální faktory.

Katecholaminy – antagonisté kalcitoninu.

Prostaglandiny – v koncentraci 10^{-9} – 10^{-7} mol/l stimulují syntézu kolagenu, v koncentraci 10^{-6} mol/l syntézu kolagenu inhibují.

Lokální faktory regulující kostní metabolismus

Faktory stimulující diferenciaci osteoblastů:

Kostní morfogenetický faktor (BMF)
Destičkový růstový faktor (PDGF)
Fibroblastový růstový faktor (FGF)
Insulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1)
transformující růstový faktor- β (TGF- β).

Faktory ovlivňující diferenciaci osteoklastů:

Kolonie stimulující faktor (CSF) – potlačuje vývoj osteoklastů.
Interferony (interferon- γ) – potlačuje diferenciaci osteoklastů.
Interleukiny (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11) – stimulují diferenciaci osteoklastů.

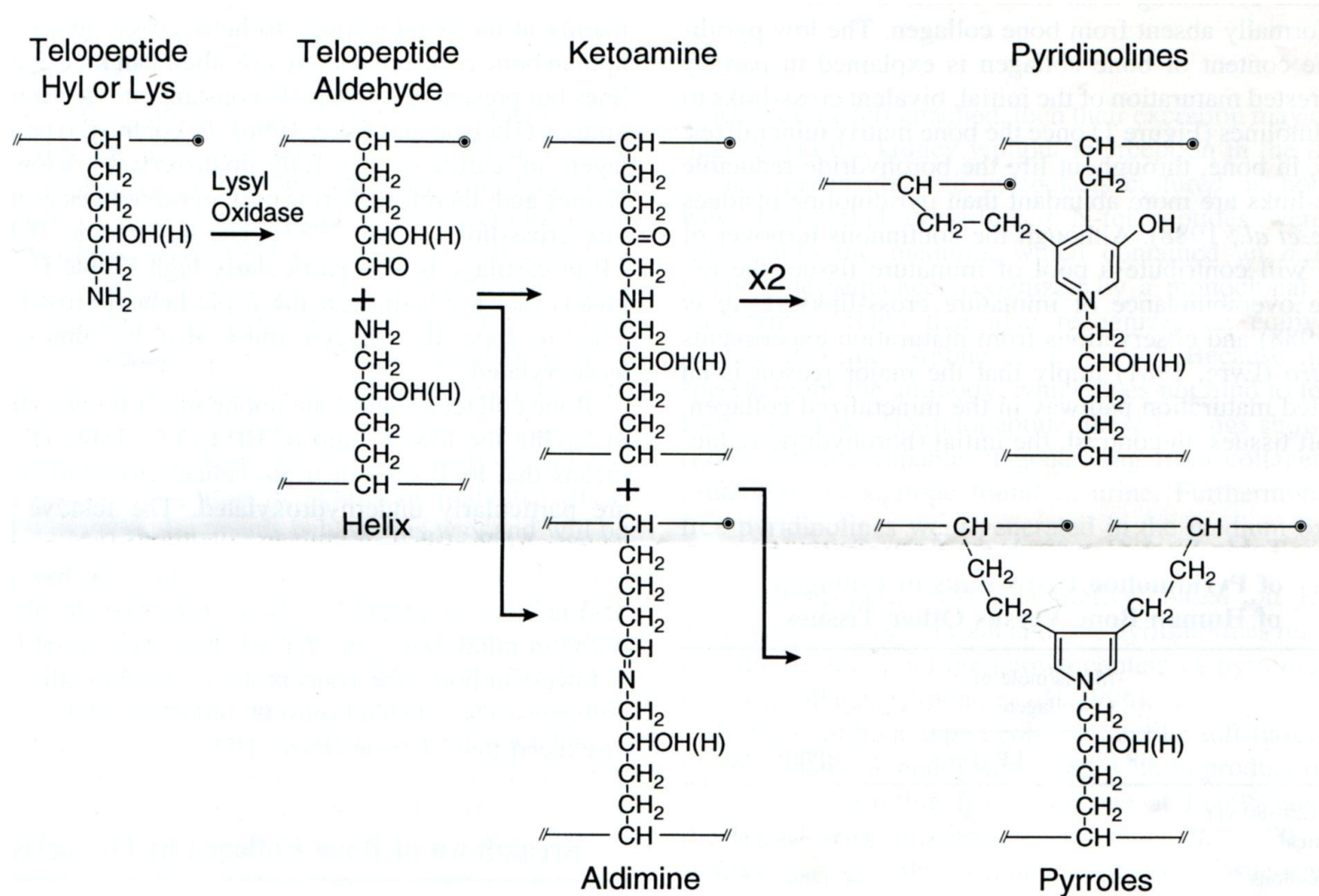
Biochemické markery kostní tvorby

- *alkalická fosfatasa*
 - izoenzym, odráží aktivitu osteoblastů
- *osteokalcin*
 - kostní glykoprotein,
 - specifický pro kost a zuby, není známa skutečná funkce
 - syntéza osteoblasty, zabudován do ECM kosti
- *prokolagenní peptidy kolagenu typu I*

Biochemické markery kostní resorpce

- *vápník* v moči – vztaženo ke kreatininu, malá specifčnost (kromě vylučování Ca z kostí se v testu odráží zpětné vychytávání Ca tubuly a renální filtrace a absorpce Ca ve střevech)
- *hydroxyprolin*
- *pyridinolin, deoxypyridinolin*

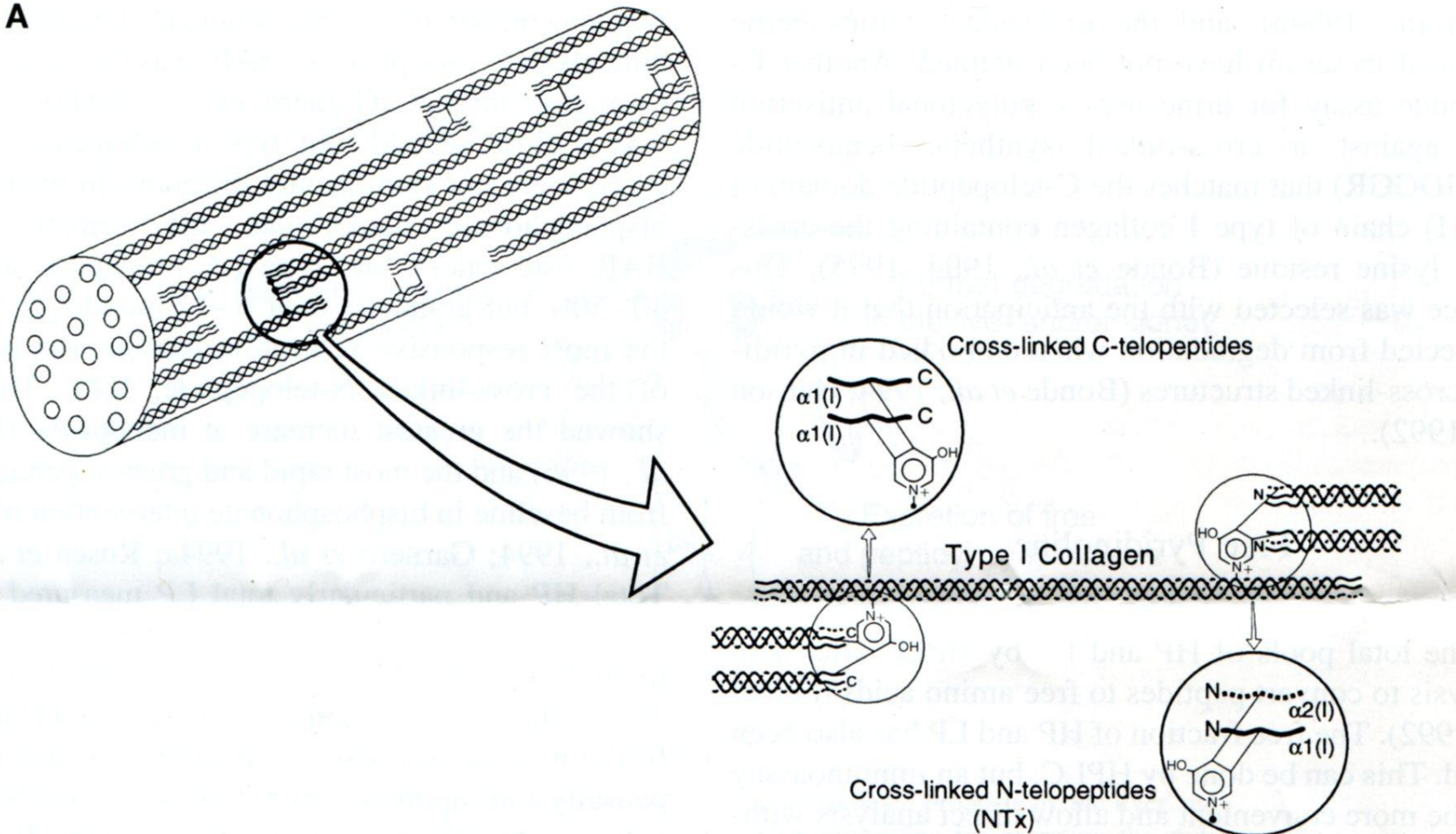
Vznik pyridinolinu a deoxypyridinolinu



Příčné vazby tvořené pyridinolinem

Pyridinolin je trojvazný, váže dva telopeptidy ke trojité šroubovici

A



Stanovení pyridinolinu a deoxypyridinolinu pomocí HPLC

