

Recent advances in understanding the pathogenesis of ochronosis

Najnowsze postępy w zrozumieniu patogenezy ochronozy

James A. Gallagher, Adam M. Taylor, Alan Boyde, Jonathan C. Jarvis, Lakshminarayan R. Ranganath

Department of Musculoskeletal Biology, Institute of Ageing and Chronic Disease, University of Liverpool, Liverpool, UK
Zakład Biologii Mięśniowo-Szkieletowej, Instytut Starzenia się i Chorób Przewlekłych, Uniwersytet w Liverpoolu, Wielka Brytania

Key words: alkaptonuria, ochronosis, homogentisic acid, osteoarthritis.

Słowa kluczowe: alkaptonuria, ochronoza, kwas homogentyzynowy, choroba zwyrodnieniowa stawów.

Summary

Alkaptonuria (AKU) is an iconic disease caused by deficiency of the enzyme homogentisate 1,2-dioxygenase (HGD). Deficiency results in an increase in the circulating concentration of homogentisic acid (HGA), which over time is deposited as pigmented polymers in tissues including sclera, heart valves and cartilage, a process described as ochronosis. Joint ochronosis causes severe, early onset osteoarthritis. Studies on *ex vivo* tissue samples, *in vitro* cell cultures and mouse models of AKU indicate that tissues are initially resistant to ochronosis and become susceptible possibly following mechanical or oxidative damage and/or local metabolic changes. There is a lack of effective biomarkers to monitor the progression of ochronosis and response to potential therapies but a disease severity index for AKU has recently been developed. Current studies are evaluating the efficacy of the potential therapy nitisinone in AKU. Research on ochronosis has led to the identification of several previously unrecognised pathophysiological features of the osteoarthritis phenotype.

Alkaptonuria (AKU) [MIM 203500] has an iconic status in the history of medical science because it was the first human disease that was recognised to conform to Mendelian autosomal recessive inheritance by Garrod over 100 years ago [1]. It was more than 50 years later before the research group led by La Du discovered that AKU is caused by the deficiency of homogentisate 1,2-dioxyge-

Streszczenie

Alkaptonuria (AKU) jest „ikonową” w historii nauk medycznych chorobą, wywoływaną niedoborem enzymu – 1,2-dioksygenazy homogentyzynianowej (HGD). Niedobór ten powoduje w krwiobiegu zwiększenie stężenia kwasu homogentyzynowego (HGA), który w miarę upływu czasu odkłada się w postaci polimerów zmieniających barwę tkanek, m.in. w twardówce, zastawkach serca oraz chrząstce, w procesie określanym mianem ochronozy. Zmiany ochronotyczne w obrębie stawów wywołują wczesną, ciężką postać choroby zwyrodnieniowej stawów. Badania nad AKU prowadzone *ex vivo* na próbkach tkanek, *in vitro* na kulturach komórek i na modelach mysich wskazują, że początkowo odporne na ochronozę tkanki z czasem stają się podatne, prawdopodobnie w następstwie uszkodzeń mechanicznych lub oksydacyjnych i/lub miejscowych zmian metabolicznych. Nie ma efektywnych biomarkerów, które umożliwiłyby monitorowanie postępu ochronozy oraz odpowiedzi na potencjalne terapie. Niedawno opracowano dla AKU indeks nasilenia choroby. Prowadzone obecnie badania oceniają skuteczność potencjalnych terapii z zastosowaniem nityzynonu w leczeniu AKU. Badania nad ochronozą doprowadziły do wyodrębnienia wielu wcześniej nieznanymi patofizjologicznych cech fenotypu choroby zwyrodnieniowej stawów.

Alkaptonuria (AKU) [MIM 203500] ma „ikonowy” status w historii nauk medycznych, ponieważ była pierwszą chorobą człowieka, którą uznano za przekazywaną zgodnie z mendelowskimi zasadami dziedziczenia autosomalnego recesywnego, co stwierdził Garrod ponad 100 lat temu [1]. Minęło ponad 50 lat, zanim grupa badawcza prowadzona przez La Du odkryła, że przyczyną AKU jest niedobór 1,2-dioksygena-

Address for correspondence:

James A. Gallagher PhD, Department of Musculoskeletal Biology, Institute of Ageing and Chronic Disease, Sherrington Building, University of Liverpool, Liverpool, tel. 0044 151 794, e-mail: jag1@liv.ac.uk

Submitted: 3.07.2012

nase (HGD) [E.C.1.13.11.5], an enzyme in the metabolism of tyrosine and phenylalanine [2] (Fig. 1). Almost another half century passed before the modern era of research on AKU began with the cloning of the human HGD gene by Fernández-Cañón and colleagues [3]. It is a single-copy gene that maps to chromosome 3q13.33 and encompasses 14 exons, which encode a protein of 445 amino acids. AKU arises from homozygous or compound heterozygous mutations in the HGD gene, with 115 different human mutations now identified [4]. AKU is an ultra-rare disease with a low prevalence of 1 : 100 000–250 000 in most ethnic groups. However, several hotspots have been identified including the Dominican Republic and North West Slovakia, where the incidence is greater than 1 : 20 000. Recently, high incidences of AKU were also discovered in specific regions of Jordan [5] and in southern India (unpublished). It is likely that there is a vast reservoir of undiagnosed AKU worldwide.

Loss of activity of the HGD enzyme results in an increase in the circulating concentration of homogentisic acid (HGA). Most of the HGA is lost through urinary excretion causing urine to darken on exposure to air. However, raised HGA levels in plasma and extracellular fluid eventually lead to ochronosis, the deposition of polymers of HGA as pigment in connective tissues including cartilage, heart valves and sclera [6, 7]. Joint ochronosis causes a severe form of osteoarthritis that is an inevitable consequence of the rare genetic disorder [8]. Tissues initially appear to be resistant to ochronosis and become susceptible possibly following mechanical or oxidative damage and/or local metabolic changes. Although most pigment is deposited extracellularly, there is strong evidence for a role of cells in the process of pigmentation. Furthermore, once pigment has been laid down in the pericellular matrix, ochronosis quickly spreads to the cellular compartment. Pigmented tissues, including cartilage, become much stiffer than non-pigmented tissues, leading to a disturbance of the load distribution and induction of stress risers [9]. Furthermore, when articular cartilage becomes highly pigmented, it stress shields the underlying bone from normal mechanical loading, which leads to an aggressive resorption of the subchondral plate, including calcified cartilage and bone. Despite the increased stiffness, the pigmented shell of the remaining articular cartilage soon fails catastrophically. Pigmented unmineralised cartilage becomes impacted on the underlying trabecular bone and embedded in the marrow space. Fragments of pigmented cartilage also become embedded in synovial tissue. Ochronosis therefore leads to painful destruction of large weight-bearing joints as well as fusion of the vertebrae, scoliosis, tendon and ligament ruptures and cardiac valve deterioration. Although ochronosis appears to be an inevitable consequence of AKU, there is considerable variability in the age of onset and severi-

ty homogentyzynianowej (HGD) [E.C.1.13.11.5], enzymu w szlaku przemian tyrozyny i fenyloalaniny [2] (ryc. 1). Nowoczesna era badań nad AKU rozpoczęła się niemal pół wieku później, wraz ze sklonowaniem genu ludzkiego HGD przez Fernández-Cañóna i wsp. [3]. Jest to gen występujący w pojedynczej kopii, umiejscowiony na chromosomie 3 w pozycji q13.33 i obejmujący 14 eksonów, kodujących białko składające się z 445 aminokwasów. Alkaptonuria jest wynikiem homozygotycznych lub złożonych heterozygotycznych mutacji w genie HGD, do chwili obecnej zidentyfikowano 115 różnych mutacji u ludzi [4]. To wyjątkowo rzadka choroba, z małą częstością występowania, rzędu 1 : 100 000–250 000, w większości grup etnicznych. Wyodrębniono jednak kilka rejonów na świecie, w których choroba występuje szczególnie często, np. Republika Dominikany oraz w północno-zachodnią część Słowacji, gdzie częstość występowania przekracza 1 : 20 000. Niedawno stwierdzono wysoką częstość występowania AKU w niektórych rejonach Jordanii [5] oraz w południowych Indiach (brak publikacji). Prawdopodobnie na świecie istnieje rozległy rezerwuuar niezdiagnozowanej AKU.

Obniżenie aktywności enzymu HGD powoduje zwiększenie stężenia krążącego kwasu homogentyzynowego (HGA). Większość HGA jest wydalana przez nerki, co powoduje, że mocz ciemnieje pod wpływem kontaktu z powietrzem. Niemniej jednak zwiększone stężenie HGA w osoczu i płynie zewnątrzkomórkowym prowadzi ostatecznie do ochronozy – odkładania się polimerów HGA w postaci barwnika w tkance łącznej, w tym w chrząstce, zastawkach serca i twardówce [6, 7]. Ochronoza stawów wywołuje ciężką postać choroby zwyrodnieniowej stawów, będącą nieuniknionym skutkiem rzadkiego zaburzenia genetycznego [8]. Początkowo tkanki wydają się odporne na ochronozę, z czasem jednak stają się podatne, prawdopodobnie w następstwie uszkodzeń mechanicznych lub oksydacyjnych i/lub miejscowych zmian metabolicznych. Mimo że większość barwnika odkłada się na zewnątrz komórek, istnieją silne dowody na udział komórek w procesie pigmentacji. Ponadto, po odłożeniu się barwnika w macierzy okołokomórkowej, ochronoza szybko rozprzestrzenia się na przedział komórkowy. Przebarwione tkanki, w tym tkanka chrzęstna, stają się znacznie sztywniejsze niż tkanki niezabarwione, co prowadzi do zaburzenia rozmieszczenia obciążenia oraz powstawania stref oddziaływania podwyższonego naprężenia („*stress risers*”) [9]. Intensywnie wysyciona barwnikiem chrząstka stawowa tworzy strefę chronioną przed naprężeniami w leżącej głębiej tkance kostnej, powodując zanik prawidłowego mechanicznego obciążania, co prowadzi do agresywnej resorpcji blaszki podchrzęstnej, w tym uwapnionej tkanki chrzęstnej i kostnej. Pomimo zwiększonej sztywności, szybko dochodzi do katastroficznego załamania wysyczonej barwnikiem skorupy pozostałej tkanki chrzęstnej. Przebarwiona, zdemineralizowana chrząstka wklina się w głąb leżącej poniżej kości gąbczastej i wnika do jamy szpikowej. Fragmenty wysyczonej barwnikiem

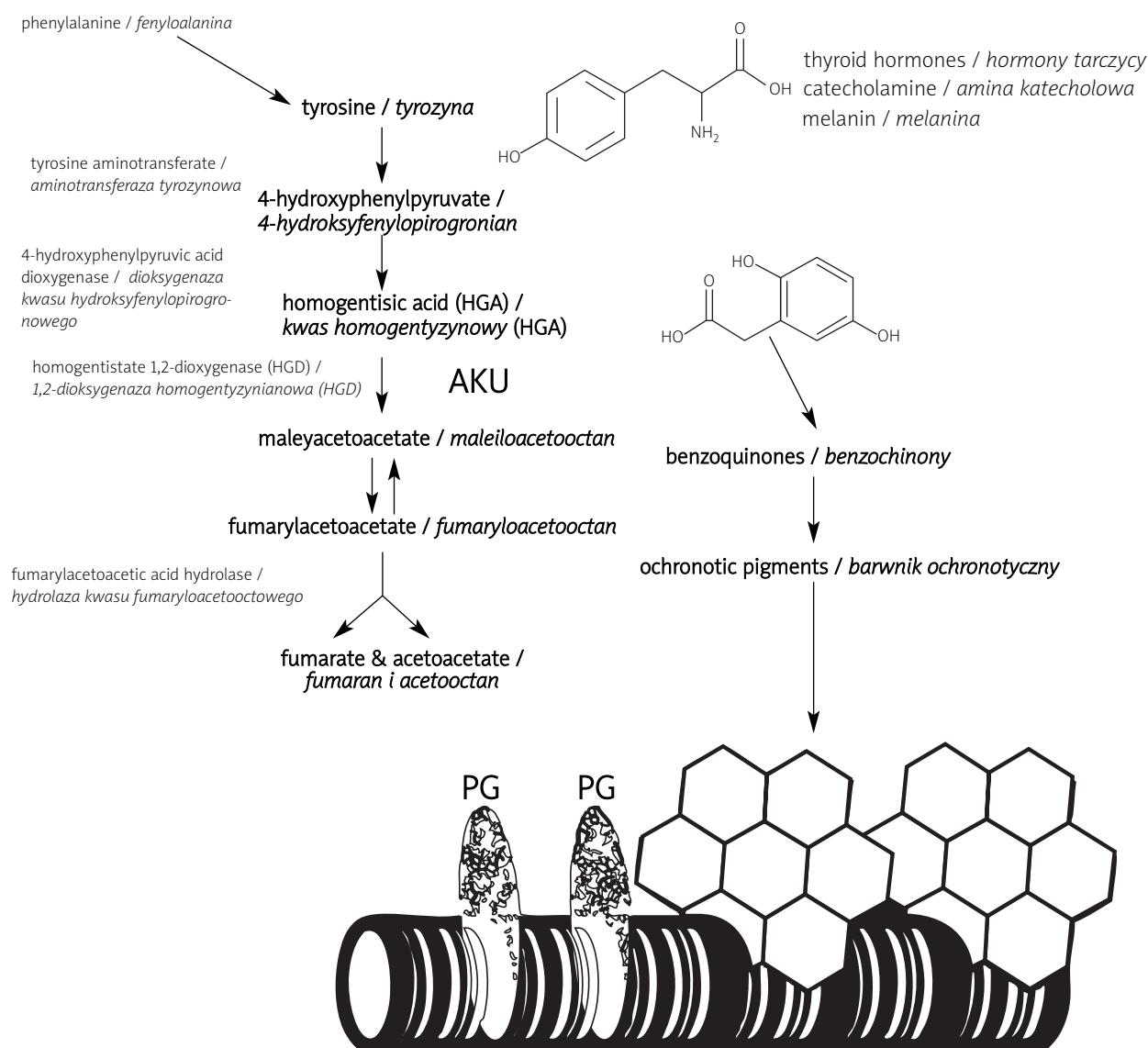


Fig. 1. Schematic representation of the metabolic defect in AKU and the development of ochronosis. Genetic lack of homogentisate 1,2-dioxygenase leads to an increase in concentration of homogentisic acid (HGA). HGA is converted into benzoquinones which bind to collagenous matrices. Initially, matrix is resistant to pigmentation, but following loss or breakdown of specific constituents, including proteoglycans (PG), the benzoquinones can access binding sites which are associated with the ultrastructural periodicity of the collagen fibrils. Once ochronosis has been initiated, polymerisation proceeds rapidly. Pigmentation increases the stiffness of the collagen fibres, which leads to further biomechanical and biochemical damage and a downward spiral of ochronosis and tissue destruction.

Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie metabolicznego defektu w AKU oraz rozwoju ochronozy. Genetyczny brak 1,2-dioksygenazy homogentyzynianowej prowadzi do zwiększenia stężenia kwasu homogentyzynowego (HGA), który ulega przemianie do benzochinonów, które wiążą się z kolagenowymi macierzami. Początkowo macierz jest odporna na pigmentację, jednak w wyniku utraty lub rozpadu określonych składników, w tym proteoglikanów (PG), benzochinony uzyskują dostęp do rejonów wiązania związanych z ultrastrukturalną okresowością włókienek kolagenowych. Wraz z inicjacją ochronozy polimeryzacja postępuje w szybkim tempie. Odkładanie się barwnika zwiększa sztywność włókien kolagenowych, co prowadzi do dalszych uszkodzeń biomechanicznych, zmian biochemicznych, nasilającej się spirali ochronozy i destrukcji tkanek.

ty, even between siblings. This indicates that genetic, biomechanical or environmental predisposition to connective tissue damage might accelerate pigmentation. Currently, there is a severe lack of effective biomarkers to monitor the progression of ochronosis and the response to potential therapies. However, a disease severity index for AKU has recently been developed [10]. This index will facilitate careful monitoring of the disease status and allow investigation of the influence of environmental factors such as occupation, diet and non-AKU genes including ageing and osteoarthritis susceptibility genes. The difference in disease susceptibility between siblings will be a powerful tool to help identify the background genetic factors that underlie the severity of the disease.

Studies on post-mortem and surgical AKU tissue samples have revealed that anatomically, ochronosis localises to areas of high mechanical loading, including the large weight-bearing joints and the aortic and mitral valves. This suggests that HGA acts as an endogenous marker of loading or mechanical stress [7]. Histological studies have revealed that in cartilage, initial pigmentation is focal and located in individual chondrocytes and their territorial matrix in calcified cartilage but then proliferates throughout the hyaline cartilage in either granular or homogeneous conglomerates (Fig. 2).

At the ultrastructural level, early pigmentation in connective tissues is associated with the periodicity of collagen [11], somewhat reminiscent of proteoglycan binding [12]. This pattern strongly indicates that there are specific binding sites for HGA critical to the initiation of pigmentation (Fig. 1). Further studies at higher resolution are required to determine the exact ultrastructural location of the HGA binding region, for example in relation to the a-d bands of collagen fibrils. The findings from transmission electron microscopy are supported by solid state NMR studies which revealed loss of order at the nanoscale [13]. Ultrastructural and biochemical studies suggest that collagen fibril damage and proteoglycan loss precede pigmentation, reinforcing the hypothesis that HGA alone is not sufficient for pigmentation and that local, systemic, environmental and/or genetic factors are required. Extracellular matrix (ECM) appears to be initially resistant to pigmentation but becomes susceptible following biochemical or biomechanical influences on the composition or structure. In support of this, *ex vivo* studies on non-AKU osteoarthritis tissue incubated in HGA have revealed focal uptake similar to the distribution of early ochronosis in AKU [14].

An *in vitro* model of ochronosis has been developed in which chondrocytes or osteosarcoma cells are cultured in medium supplemented with 0.33 μ M–0.33 mM HGA, which includes the range observed in the plasma of AKU patients and which is not toxic to cells [15]. Schmorl's stain, which is a sensitive and reliable stain for ochronosis, is used

chrząstki osadzają się również w tkance maziówki. Ochronozą doprowadza zatem do bolesnego zniszczenia dużych, dźwigających ciężar ciała stawów oraz do zrastania się kręgów, skoliozy, zerwania ścięgien i więzadeł, a także do postępującego uszkodzenia zastawek serca. Mimo że ochronozą wydaje się nieuniknionym następstwem AKU, obserwuje się znaczną zmienność wieku wystąpienia oraz nasilenia choroby, nawet w przypadku rodzeństwa. Sygnalizuje to, że genetyczne i biomechaniczne predyspozycje lub uwarunkowania środowiskowe sprzyjające uszkodzeniom tkanki łącznej, mogą przyspieszać proces pigmentacji. Obecnie nie ma efektywnych biomarkerów, które umożliwiłyby monitorowanie postępu ochronozy oraz odpowiedzi na potencjalne terapie. Niemniej jednak w ostatnim czasie opracowano indeks nasilenia choroby dla AKU [10]. Indeks ułatwi dokładne monitorowanie statusu choroby i umożliwi badania nad wpływem czynników środowiskowych, takich jak zawód, dieta, oraz genów niezwiązanych z AKU, w tym genów warunkujących podatność na starzenie się i chorobę zwyrodnieniową stawów. Różnice w podatności na alkaptonurię między rodzeństwem są potężnym narzędziem, które pomoże zidentyfikować drugorzędowe uwarunkowania genetyczne decydujące o nasileniu choroby.

Badania nad próbkami tkanek pacjentów z AKU pobranymi pośmiertnie oraz w trakcie zabiegów chirurgicznych wykazały, że pod względem anatomicznym zmiany ochronotyczne lokalizują się w rejonach występowania dużych obciążeń mechanicznych, w tym w dużych, dźwigających ciężar ciała stawach oraz w zastawce aortalnej i dwudzielnej. Sugeruje to, że HGA odgrywa rolę endogennego markera obciążenia lub naprężenia mechanicznego [7]. Badania histologiczne ujawniły, że w przypadku tkanki chrzęstnej pierwotny charakter procesu odkładania barwnika jest ogniskowy i zachodzi w pojedynczych chondrocytach oraz terytorialnie przynależnej do nich macierzy uwapnionej chrząstki, następnie jednak dochodzi do rozprzestrzeniania barwnika w obrębie całej chrząstki szklistej w postaci ziarnistych lub jednorodnych konglomeratów (ryc. 2).

Na poziomie ultrastrukturalnym wczesna pigmentacja tkanki łącznej jest związana z okresowością kolagenu [11], przypominającą w pewnym stopniu wiązania proteoglikanów [12]. Rozmieszczenie zmian przemawia o zdecydowanie za obecnością swoistych miejsc wiążących dla HGA o krytycznym znaczeniu dla zapoczątkowania procesu odkładania barwnika (ryc. 1). Konieczne są dalsze badania prowadzone przy wysokiej rozdzielczości, aby określić dokładną lokalizację ultrastrukturalną rejonu wiązania HGA, np. w odniesieniu do prążków a-d włókienek kolagenowych. Wyniki uzyskane dzięki transmisyjnej mikroskopii elektronowej znajdują potwierdzenie w badaniach NMR w fazie stałej, które ujawniły utratę uporządkowania w nanoskali [13]. Badania ultrastrukturalne i biochemiczne sugerują, że uszkodzenie włókienek kolagenowych oraz utrata proteoglikanów poprzedza powsta-

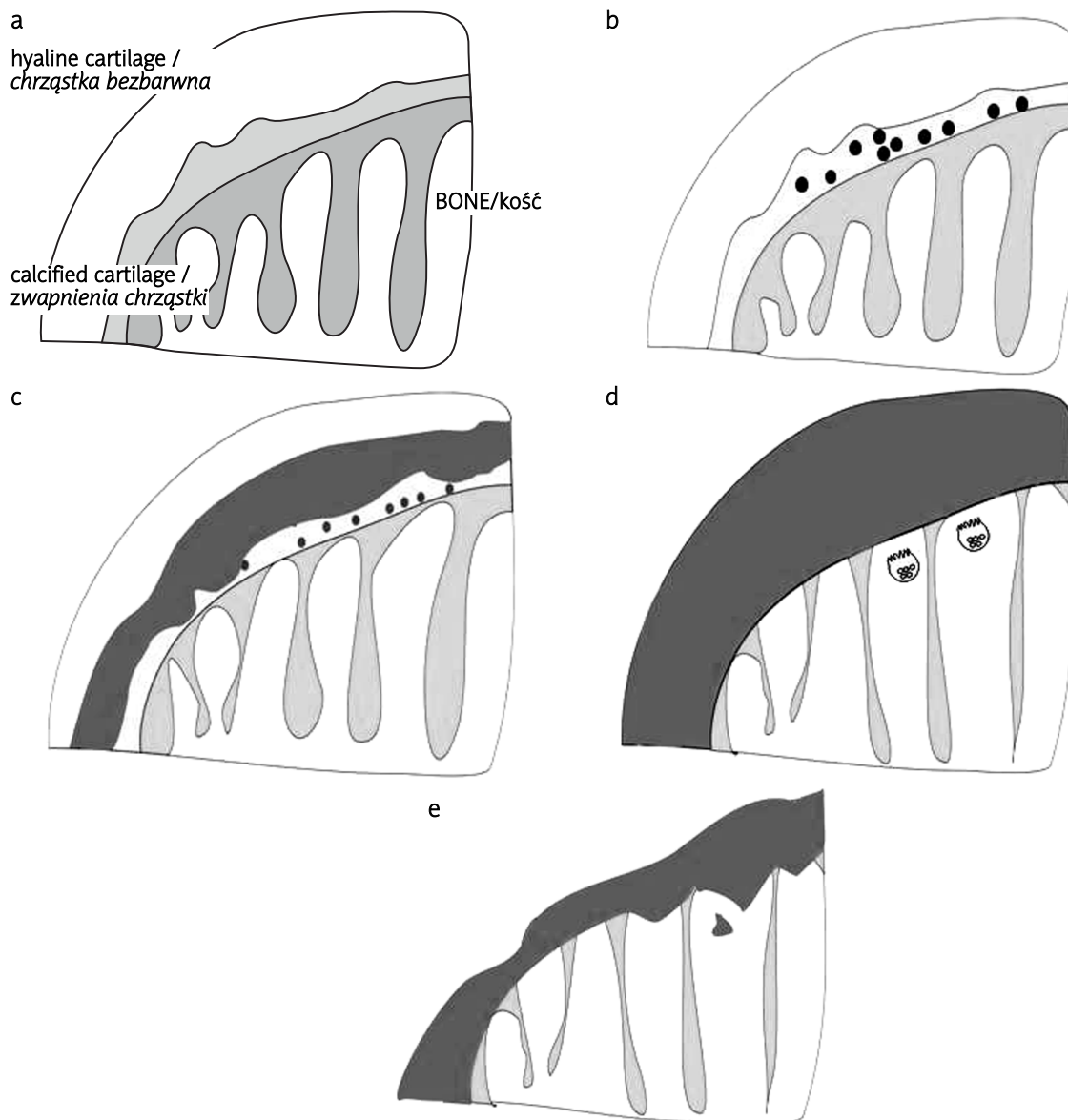


Fig. 2. Schematic representation of the progression of ochronosis in articular cartilage from initiation in calcified cartilage to eventual destruction of the joint: a) ochronosis begins with the deposition of pigment in individual chondrocytes and their territorial matrix in calcified cartilage. Pigmentation leads to focal increases of stiffness altering the load distribution and inducing stress risers; b) ochronosis spreads to other chondrons in the calcified matrix, then (c) proliferates throughout the hyaline cartilage; d) ochronotic cartilage shields the underlying bone from normal mechanical loading, leading to aggressive resorption of the subchondral plate, including calcified cartilage and bone; e) despite the increased stiffness, the pigmented shell of the remaining articular cartilage fails catastrophically. Pigmented cartilage becomes impacted on the underlying trabecular bone and embedded in the marrow space.

Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie rozwoju zmian ochronotycznych w chrząstce stawowej od początku procesu w uwapnionej chrząstce aż do ostatecznego zniszczenia stawu: a) proces ochronozy zaczyna się wraz z odkładaniem się barwnika w poszczególnych chondrocytach i przynależnej do nich terytorialnie macierzy w uwapnionej chrząstce. Pigmentacja prowadzi do występowania ognisk wzmożonej sztywności zmieniających rozmieszczenie obciążenia i powodujących powstawanie stref podwyższonego naprężenia; b) ochronoza rozprzestrzenia się na inne chondrony w obrębie zwapnianej macierzy, a następnie (c) na całą chrząstkę szklistą; d) ochronotycznie zmieniona chrząstka ostania leżąca poniżej kość, powodując zanik prawidłowego mechanicznego obciążenia i prowadząc do agresywnej resorpcji blaszki podchrzęstnej, łącznie z uwapnioną chrząstką i kością; e) mimo wzmożonej sztywności, dochodzi do katastroficznego zatamania przebarwionej skorupy pozostałej tkanki chrzęstnej. Wysycona barwnikiem chrząstka wklina się w głąb leżącej poniżej kości gąbczastej i wnika do jamy szpikowej.

to detect pigment deposits *in vitro*. Microscopic and ultrastructural examination revealed deposition of pigmented granules in the cells and associated matrix. Deposition is much more rapid than *in vivo*, supporting the theory that protective mechanisms exist in tissues *in situ* because ECM components are assembled into complex structures in which fibrous proteins, proteoglycans and glycosaminoglycans are associated. This complex association is not replicated exactly *in vitro* and it is likely that factors protecting ECM from pigmentation *in situ* are absent and thus pigmentation is accelerated. Modifying the culture conditions to produce an ECM that is resistant to pigmentation will provide information on the mechanism of ochronosis. The rate of pigmentation *in vitro* can be influenced by antioxidants [16].

Despite recent progress, the molecular mechanism of ochronosis has not yet been elucidated. This is partly because the first clinical sampling of ochronotic tissue is typically during joint replacement when the disease is advanced. To follow the earliest stages of pigmentation a robust animal model of ochronosis is required. Although a mouse model of AKU (HGD^{-/-}) was developed almost 20 years ago by *N*-ethyl *N*-nitrosourea-induced mutagenesis [17], until very recently it was thought that these mice did not develop ochronosis, despite excreting sufficient HGA to cause darkening of urine. Renal and joint ochronosis has been identified in a complex mouse model in which the tyrosinaemia type 1 mutation (Fah^{-/-}) is combined with heterozygosity for Hgd (Hgd^{+/-}). After a period of tyrosinaemia type I, some mice show loss of heterozygosity for Hgd in liver nodules, becoming AKU-like [18]. Ochronosis in this model is probably in part due to severe renal pathology and because it follows spontaneous mutation is not a practical experimental model. Recently, however, careful whole life observation has revealed joint ochronosis in AKU (HGD^{-/-}) mice that have no confounding pathology. Ochronosis develops in the cartilage in a manner analogous to that observed in the human disease (unpublished).

In addition to providing a new model to investigate pathogenesis, AKU mice will provide an important model to screen new therapeutic agents. To date the most promising therapy is nitisinone, an inhibitor of 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase which has been used successfully to treat hereditary tyrosinaemia 1 (HT1). A recent clinical trial in established AKU demonstrated that despite reducing plasma HGA by approximately 95% over 36 months, nitisinone therapy produced no improvement in primary or secondary clinical parameters, including hip rotation and spinal flexion, probably because of existing irreparable pathology [19]. Early intervention with nitisinone, in AKU patients who have not yet developed ochronosis, should prevent cartilage destruction and debilitating arthritis.

wanie przebarwień, wzmacniając hipotezę, że obecność samego HGA nie wystarczy, by wywołać proces pigmentacji, oraz że niezbędne jest oddziaływanie czynników miejscowych, ogólnych, środowiskowych i/lub genetycznych. Macierz zewnątrzkomórkowa (*extracellular matrix* – ECM) wydaje się początkowo odporna na pigmentację, jednak z czasem staje się podatna, prawdopodobnie w wyniku oddziaływania czynników mechanicznych lub biomechanicznych wpływających na jej skład lub budowę. Potwierdzają to badania *ex vivo* tkanek pobranych od pacjentów z niezwiązaną z AKU chorobą zwyrodnieniową stawów, inkubowanych w HGA, w których wykazano obecność ogniskowe odkładanie się o rozmieszczeniu podobnym do wczesnych zmian ochronotycznych w AKU [14].

Opracowano model ochronozy *in vitro*, w którym hoduje się chondrocyty lub komórki kostniakomięsaka w medium wzbogaconym 0,33 μ M–0,33 mM HGA, co obejmuje zakres oznaczany w surowicy pacjentów z AKU, który nie jest toksyczny dla komórek [15]. Do identyfikacji złogów barwnika *in vitro* stosuje się barwienie Schmorla, czułą i wiarygodną metodę barwienia w kierunku ochronozy. Badania mikroskopowe i ultrastrukturalne ujawniły złogi zabarwionych ziarnistości w komórkach i otaczającej macierzy. Proces odkładania przebiega znacznie szybciej niż w modelu *in vivo*, co potwierdziło teorię o istnieniu mechanizmów ochronnych w tkankach *in situ*, ponieważ składniki ECM układają się w złożone struktury składające się ze związanych ze sobą białek fibrylarnych, proteoglikanów oraz glikozaminoglikanów. Ten złożony układ powiązań nie jest szczegółowo odtwarzany *in vitro*; prawdopodobnie brakuje czynników, występujących *in situ*, chroniących ECM przed zabarwieniem i tym samym dochodzi do przyspieszenia procesu pigmentacji. Zmiana warunków hodowli, by uzyskać ECM odporne na odkładanie barwnika, dostarczy informacji o mechanizmie ochronozy. Tempo powstawania zabarwień *in vitro* może się zmieniać pod wpływem antyoksydantów [16].

Pomimo odnotowanych ostatnio postępów, mechanizm molekularny ochronozy pozostaje niewyjaśniony. Po części jest to spowodowane faktem, że pierwsze pobranie zmienionych ochronotycznie tkanek w warunkach klinicznych odbywa się zazwyczaj w trakcie zabiegu wymiany stawu, przy zaawansowanym procesie chorobowym. Śledzenie najwcześniejszych etapów odkładania barwnika wymaga wytrzymałego modelu zwierzęcego ochronozy. Chociaż mysz model AKU (HGD^{-/-}) opracowano niemal 20 lat temu w wyniku wywołanej *N*-etylo-*N*-nitrozomocznikiem mutagenyzy [17], do niedawna sądzono że ochronoza nie rozwija się u tych myszy pomimo wydalania HGA w ilościach wystarczających do wywołania ciemniejszego zabarwienia moczu. Wyodrębniono ochronozę nerek i stawów, stosując złożony model myszy, w którym mutacja tyrozydemii typu 1 (Fah^{-/-}) występowała w skojarzeniu z heterozygotycznością Hgd (Hgd^{+/-}). Po okresie tyrozydemii typu 1, u niektó-

The biomedical literature contains many examples of how research on extreme phenotypes in monogenic diseases has helped elucidate the molecular pathogenesis of more common disorders. It is likely that investigating ochronosis will provide important insights into pathogenesis of the more common varieties of osteoarthritis, particularly the biochemical and structural changes at the initial stages of osteoarthritic degeneration. In support of this concept, several previously unrecognised pathophysiological features of the human osteoarthritis phenotype have already been identified from studies of AKU. These include complete resorption of the subchondral plate [9] and trabecular excrescences, which are novel microanatomical structures that were first identified in AKU where they are abundant and subsequently at a lower frequency in osteoarthritis [20].

The study was funded by grants from the Big Lottery Fund, the AKU Society and the Rosetrees Trust.

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Piśmiennictwo

1. Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 1902; 2: 1616-1620.
2. La Du BN, Zannoni VG, Laster L, et al. The nature of the defect in tyrosine metabolism in alkaptonuria. *J Biol Chem* 1958; 230: 251-260.
3. Fernández-Cañón JM, Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, et al. The molecular basis of alkaptonuria. *Nat Genet* 1996; 14: 19-24.
4. Zatkova A. An update on molecular genetics of Alkaptonuria (AKU). *J Inher Metab Dis* 2011; 34: 1127-1136.
5. Al-Sbou M, Mwafi N, Lubad MA. Identification of forty cases with alkaptonuria in one village in Jordan. *Rheumatol Int* 2011, Epub ahead of print.
6. Phomphutkul C, Introne WJ, Perry MB, et al. Natural history of alkaptonuria. *N Engl J Med* 2002; 347: 2111-2121.
7. Helliwell TR, Gallagher JA, Ranganath L. Alkaptonuria – a review of surgical and autopsy pathology. *Histopathology* 2008; 53: 503-512.
8. Kraus VB. Rare osteoarthritis: ochronosis, Kashin-Beck disease, and Mseleni joint disease. Rare osteoarthritis: Ochronosis, Kashin-Beck disease and Mseleni joint disease. In: *Rheumatology 5th edition*: Hochberg MC, Smolen SJ, Weinblatt ME, Weisman MH (eds.). Mosby, Philadelphia 2011; 1825-1837.
9. Taylor AM, Boyde A, Wilson PJ, et al. The role of calcified cartilage and subchondral bone in the initiation and progression of ochronotic arthropathy in alkaptonuria. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 3887-3896.

rych myszy dochodzi do utraty heterozygotyczności Hgd w grudkach wątroby i przybierają one postać AKU-podobną [18]. Ochronozą w tym modelu jest prawdopodobnie spowodowana po części poważnymi zmianami patologicznymi nerek, a ponieważ dochodzi do niej w wyniku spontanicznej mutacji, nie stanowi praktycznego modelu doświadczalnego. Niemniej prowadzone ostatnio dokładne obserwacje obejmujące okres całego życia wykazały obecność ochronozy w obrębie stawów w AKU (HGD \rightarrow) u myszy bez innej patologii. Ochronozą rozwija się w chrząstce w sposób analogiczny do obserwowanego u ludzi (brak publikacji).

Poza dostarczeniem nowego modelu do badań nad patogenezą, myszy z AKU postępują za ważny model do badań skринingowych nowych preparatów leczniczych. Obecnie najbardziej obiecującym preparatem jest nityzynom, inhibitor dioksygenazy kwasu 4-hydroksyfenylopirogrońowego, stosowany z powodzeniem do leczenia dziedzicznej tyrozydemii typu 1 (HT1). Przeprowadzone niedawno badanie kliniczne nad ustaloną AKU wykazało, że pomimo zmniejszenia stężenia HGA w osoczu o ok. 95% w 36 miesięcy terapia nityzynomem nie doprowadziła do jakiegokolwiek poprawy pierwszo- ani drugorzędowych parametrów klinicznych, w tym zakresu rotacji w stawie biodrowym czy zgięcia kręgosłupa, prawdopodobnie z powodu istniejącej, niemożliwej do naprawienia patologii [19]. Należy się spodziewać, że wczesna interwencja nityzynomem u pacjentów z AKU, u których nie doszło jeszcze do ochronozy, powinna zapobiec niszczeniu chrząstki i upośledzającym zmianom zwyrodnieniowym stawów.

Piśmiennictwo biomedyczne podaje liczne przykłady na to, jak badania skrajnych fenotypów w chorobach monogenicznych przyczyniły się do wyjaśnienia patogenezы molekularnej wielu bardziej rozpowszechnionych schorzeń. Należy się spodziewać, że badania nad ochronozą dostarczą ważnych informacji o patogenezie bardziej rozpowszechnionych postaci choroby zwyrodnieniowej stawów, szczególnie w zakresie zmian biochemicznych i strukturalnych na początkowym etapie degeneracji zwyrodnieniowej stawów. Konceptę tę potwierdza fakt, że w wyniku prowadzonych badań nad AKU, doszło już do wyodrębnienia wielu wcześniej nieznanых patofizjologicznych cech ludzkiego fenotypu choroby zwyrodnieniowej stawów. Można tu wymienić całkowitą resorpcję blaszki podchrzęstnej [9] oraz beleczkowate wyrośla, nowe struktury mikroanatomiczne zidentyfikowane po raz pierwszy w AKU, gdzie występują w dużych ilościach, a następnie w chorobie zwyrodnieniowej stawów, w której występują z mniejszą częstością [20].

Badanie było finansowane z grantu Big Lottery Fund, AKU Society, Rosetrees Trust.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

10. Cox TF, Ranganath L. A quantitative assessment of alkaptonuria: testing the reliability of two disease severity scoring systems. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 1153-62.
11. Taylor AM, Wlodarski B, Prior IA, et al. Ultrastructural examination of tissue in a patient with alkaptonuric arthropathy reveals a distinct pattern of binding of ochronotic pigment. *Rheumatology* 2010; 49: 1412-1414.
12. Orgel JP, Eid A, Antipova O, et al. Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding. *PLoS One* 2009; 4(9): e7028.
13. Chow WY, Taylor AM, Reid DG, et al. Collagen atomic scale molecular disorder in ochronotic cartilage from an alkaptonuria patient, observed by solid state NMR. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 1137-1140.
14. Tinti L, Spreafico A, Chellini F, et al. A novel ex vivo organotypic culture model of alkaptonuria-ochronosis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29: 693-696.
15. Tinti L, Taylor AM, Santucci A, et al. Development of an in vitro model to investigate joint ochronosis in alkaptonuria. *Rheumatology (Oxford)* 2011; 50: 271-277.
16. Braconi D, Laschi M, Taylor AM et al. Proteomic and redox-proteomic evaluation of homogentisic acid and ascorbic acid effects on human articular chondrocytes. *J Cell Biochem* 2010, 111: 922-932.
17. Montagutelli X, Lalouette A, Coudé M, et al. AKU, a mutation of the mouse homologous to human alkaptonuria, maps to chromosome 16. *Genomics* 1994; 19: 9-11.
18. Taylor AM, A Preston A, Paulk NK, et al. Ochronosis in a murine model of alkaptonuria is synonymous to that in the human condition. *Osteoarthritis Cartilage* 2012; 20: 880-886.
19. Introne WJ, Perry MB, Troendle J, et al. A 3-year randomized therapeutic trial of nitisinone in alkaptonuria. *Mol Genet Metab* 2011; 103: 307-314.
20. Taylor AM, Boyde A, Davidson JS, et al. Identification of trabecular excrescences, novel microanatomical structures, present in bone in osteoarthropathies. *Eur Cell Mater* 2012; 23: 300-308.