

# Роль простагландина E2 в ингибировании разрушения коллагена суставного хряща больных остеоартрозом

Е.В.Четина Е.В.<sup>1,3</sup>, Д. ДиБатиста<sup>2</sup>, А.Р.Пул<sup>1</sup>

1-Лаборатория суставных заболеваний, Детская больница Шрайнерсов, Отделение хирургии и медицины Университета МакГилл,

2-Отделение ревматологии, Факультет медицины Университета МакГилл, Монреаль, Квебек, Канада

3-НИИР РАМН, Москва

## Резюме

**Цель.** Изучить роль простагландина E2 (ПГЕ2) в ингибировании расщепления коллагена 2 типа эксплантатами суставного хряща больных остеоартрозом (ОА).

**Материал и методы.** Эксплантаты хрящей больных ОА культивировали в присутствии ПГЕ2 в концентрации от 1пг до 10нг/мл. Расщепление коллагена 2 типа оценивали, используя иммуноферментный анализ. Экспрессию генов определяли посредством ПЦР в реальном времени.

**Результаты.** В эксплантатах хрящей больных ОА расщепление коллагена 2 типа подавлялось ПГЕ2 в концентрации 10 пг/мл, а также 5нг/мл трансформирующего ростового фактора (ТРФ) β2. Подавления деградации протеогликана (агрекана) при данной концентрации ПГЕ2 не происходило. Анализ экспрессии генов у 5 ОА пациентов показал, что 10пг/мл ПГЕ2 подавлял экспрессию металломоноксигеназы (ММП)-13 и ММП-1, а также провоспалительных цитокинов: интерлейкина (ИЛ)-1β и фактора некроза опухоли (ФНО)α, и маркера гипертрофии хондроцитов-коллагена 10 типа (COL10A1). Напроксен, неселективный ингибитор циклооксигеназы (СОХ)-1 и -2, в концентрации от 5 до 30мкг/мл блокировал индуцированное ТРФβ2 ингибирование расщепления коллагена, указывая, что ПГЕ2 опосредует влияние этого ростового фактора. Сам напроксен в концентрации 5мкг/мл увеличивал разрушение коллагена.

**Заключение.** Проведенное исследование показало, что ПГЕ2 в концентрации гораздо ниже наблюдаемых при воспалении является хондропротектором, поскольку способен селективно подавлять разрушение коллагена в хряще больных ОА. Кроме того, гипертрофия хондроцитов хряща при ОА, функционально связанная с усиленным расщеплением коллагена, также регулируется низкими концентрациями ПГЕ2.

**Ключевые слова:** остеоартроз, суставной хрящ, деградация коллагена 2 типа, простагландин E2, экспрессия генов, напроксен

Остеоартроз (ОА) является системным заболеванием, которое может поражать один или несколько суставов и сопровождается дегенеративными изменениями суставного хряща, ремоделированием субхондральной кости и воспалением синовиальной оболочки [1]. В суставном хряще происходит прогрессирующая протеолитическая деградация внеклеточного матрикса (ВКМ), который в основном состоит из коллагена 2 типа и агрекана, что приводит к разрушению хряща. Этот процесс включает фенотипические изменения хондроцитов, связанные с их гипертрофией, а именно продукцией коллагена 10 типа (маркера гипертрофии

хондроцитов) и увеличением активности коллагеназы ММП-13, подобно тому, как это происходит в ростковой пластинке [1-3].

В настоящее время не существует лекарств, лечающих ОА. Воспаление индуцирует увеличение синтеза циклооксигеназы-2 (СОХ-2) -зависимых простагландинов (ПГ), которые сенсibiliзируют периферические окончания ноцицепторов и вызывают ощущение боли [4]. Поэтому нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), в т.ч. специфические СОХ-2 ингибиторы, широко используются для подавления боли, поскольку подавляют продукцию ПГ циклооксигеназой.

Простагландины, в особенности главный из них — ПГЕ2, синтезируемый в хряще [5], спонтанно освобождаются в хряще больных ОА в количествах, в 50 раз превышающих присутствующие

в нормальном хряще и в 18 раз — обнаруживаемые в нормальном хряще, стимулированном цитокинами [6]. Сильное увеличение экспрессии СОХ-2 в синовиальных мембранах и хряще у больных ОА привело к предположению, что селективное ингибирование СОХ-2 может привести к улучшению состояния этих пациентов [7].

Между тем показано, что ПГЕ2, генерируемый хондроцитами, физиологически необходим для поддержания гомеостаза хряща [6]. Поскольку СОХ-2 в норме экспрессируется в некоторых тканях, например, в клубочках и корковом слое почек, ПГЕ2 может иметь противовоспалительное действие [4, 8]. Протективные свойства ПГЕ2 могут также обуславливаться его способностью ингибировать экспрессию коллагеназы и стромелизина, индуцируемых интерлейкином (ИЛ)-1 $\beta$  в фибробластах синовиоцитов [9, 10], стимулировать синтез коллагена и протеогликана [11-13] и пролиферацию хондроцитов [11, 14].

Более того недавно мы показали, что трансформирующий ростовой фактор (ТРФ) $\beta$ 2 способен подавлять гипертрофию хондроцитов, расщепление коллагена, экспрессию коллагеназ и провоспалительных цитокинов в эксплантатах суставных хрящей больных ОА [3]. Это сопровождалось повышением экспрессии простагландин Е синтазы 1 (ПГЕС-1) и секреции ПГЕ2. В данной работе мы решили проверить, может ли ПГЕ2 ингибировать разрушение коллагена в остеоартрозном суставном хряще.

### **Материал и методы**

#### **Подготовка суставного хряща больных ОА**

Суставной хрящ дистальной части бедренной кости больных ОА получали после полного удаления коленного сустава при артропластике. В исследовании использованы хрящи 19 пациентов (4 муж., ср. возраст 73.7 $\pm$ 6.4 и 15 жен., ср. возраст 77.2 $\pm$ 11.3). ОА был диагностирован в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов [15].

Хрящи готовили по общепринятой методике [3, 16]. Хрящи больных ОА трижды отмывали ДМЕМ-А (Дюльбекко модифицированной средой Игла —А) (Life Technologies), содержащей также 20 ммоль/л буфера HEPES, pH 7.4, 45 ммоль/л NaHCO<sub>3</sub>, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина и 150 мкг/мл гентамицин сульфата. Срезанный с кости суставной хрящ разрезали на кубики размером 2х2 мм<sup>2</sup>. Использовали весь материал суставного хряща каждого пациента (степень разрушения от 4 до 12 баллов по шкале Манкина) по общепринятой методике [16]. 50-70 мг (5-7 кубиков) предварительно культивировали на планшетах (48 лунок от Costar 3548) в течение 48 часов при 37°C в 1 мл ДМЕМ-А в атмосфере 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>.

#### **Культивирование хрящевых эксплантатов**

Среду меняли через 48 часов (следующий после этого день считали началом опыта, день 0), а затем — через каждые 4 дня. Свежеприготовленные рас-

творы ПГЕ2 (Sigma) в конечной концентрации в 10 фг-10 нг/мл или 5 нг/мл ТРФ $\beta$ 2 (R&D Systems), в отсутствие или в присутствии 5, 10 или 30 мкг/мл напроксена (Sigma) или одного напроксена добавляли в среду А при каждой ее смене. В контрольный образец хряща больного ОА добавляли только свежую среду.

Хрящи (каждый опытный вариант в трех повторностях) культивировали 16 дней. Культуральную среду меняли каждые 4 дня и собирали ее при каждой смене, а затем хранили при -20°C до использования. По окончании опыта в образцах измеряли активность расщепления коллагена и освобождения протеогликанов. Для изучения экспрессии генов эксплантаты культивировали 24 часа и анализировали, как описано ниже.

#### **Определение активности расщепления коллагена 2 типа коллагеназой с использованием энзимологического иммуносорбентного метода (ELISA)**

Эксплантаты хрящей после 16 дней культивирования экстрагировали альфа-химотрипсином, чтобы перевести в раствор, не переваривая, денатурированный коллаген, включая карбокси-терминальный нео-эпитоп COL2-3/4C (C1,2C), образуемый при расщеплении коллагена 2 типа коллагеназой. Его содержание в культуральной среде и альфа-химотрипсиновом экстракте хряща определяли посредством ELISA [17, 18]. Суммарный нео-эпитоп расщепления в хряще и среде рассчитывали суммированием данных анализа каждого образца среды и экстракта хряща. Результаты рассчитывали в пикомолях эпитопа на мг сырого веса хряща. Молекулярная масса стандартного пептида эпитопа равна 608 дальтон.

#### **Определение содержания свободных протеогликанов**

Протеогликаны тестировали в экстрактах хрящевой ткани и культуральной среде по количеству сульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ), которые преимущественно содержат протеогликан агрекана. Для этого использовали колориметрический метод связывания 1,9-диметил-метиленового синего [19]. Суммарное освобождение протеогликанов (ГАГ в среде) и его содержание в хряще (ГАГ в хряще) рассчитывали в мкг ГАГ /мг сырого веса хряща. Освобожденные ГАГ рассчитывались как процент от суммы общих суммарных ГАГ хряща и ГАГ, освобожденных в среду. Это дает наиболее точное представление о количестве освобожденных ГАГ, учитывая значительные вариации содержания ГАГ в ткани хрящей больных ОА [18, 20].

#### **Выделение общей РНК и обратная транскрипция (ОТ)**

Суммарную РНК выделяли по общепринятой методике (3) из эксплантатов хрящей больных ОА после их культивирования в течение 24 часов в присутствии 10 пг/мл ПГЕ2 или в его отсутствие (контроль). Суммарную РНК хряща использовали

в ОТ реакции, которую проводили в соответствии с рекомендацией производителя.

#### Количественный анализ экспрессии генов посредством ПЦР в режиме реального времени

Наборы праймеров и зондов для TaqMan анализаторов экспрессии генов получали из компании Applied Biosystems: металлопротеиназу матрикса (ММП)-13 (Hs00233992\_m1), ММП-1 (Hs00233958\_m1), COL10A1 (Hs00166657), ИЛ-1 $\beta$  (Hs00174097\_m1) и фактор некроза опухоли (ФНО) $\alpha$  (Hs00174128\_m1). Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (ГЗФДГ) использовали в качестве эндогенного контроля при расчетах уровней экспрессии генов.

Количественный анализ экспрессии генов проводили с использованием системы ПЦР реального времени 7500 (Applied Biosystems). После ОТ продукт амплифицировали в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл универсальной реакционной смеси, 900 нМ прямого и обратного праймеров, 50нМ зонда и 1 мкл ДНК. После первого цикла при 50°C в течение 2 мин и начальной активации при 95°C в течение 10 мин проводили 40 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации 15 сек при 95°C и стадии отжига и синтеза в течение 1 мин при 60°C. Для каждой экспериментальной точки анализировали 3 образца в двух экспериментах. Три контрольных образца, амплифицируемых в отсутствие «матрицы», давали отрицательную реакцию.

Для предотвращения вариаций по эффективности в разных экспериментах во всех образцах одновременно проводили ОТ и амплифицировали в ПЦР реального времени.

Статистический анализ: Данные количественных экспериментов представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение. Анализы трехкратно повторяли. Тест на нормальность показал, что результаты соответствовали кривой распределения Гаусса. Для статистической обработки результатов использовали тесты Ман-Уитни и парный тест Стьюдента (t-тест). Значения вероятности ошибки менее 0,05 считались статистически значимыми.

### Результаты

#### Ингибирование коллагеназной активности посредством ПГЕ2

Наши предыдущие исследования показали, что в присутствии ТРФ $\beta$ 2 в культуральной среде обнаруживался ПГЕ2 в концентрации от 4 до 125 пг/мл. Мы проверили, повлияет ли добавление ПГЕ2 в таких концентрациях на расщепление коллагена 2 типа коллагеназой в эксплантатах хрящей больных ОА. Оказалось, что экзогенный ПГЕ2 действительно подавлял расщепление коллагена при его добавлении в низкой концентрации, 1 пг/мл, у одного из 4 пациентов (рис. 1б). Вместе с тем в большинстве исследованных хрящей (у 3 пациентов) значительное подавление расщепления коллагена наблю-

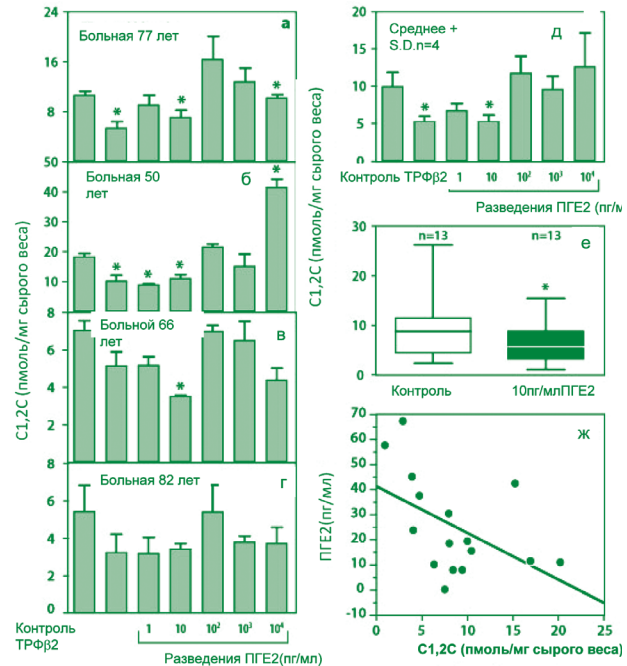


Рисунок 1

Ингибирование расщепления коллагена посредством ТРФ $\beta$ 2 (5нг/мл) и ПГЕ2 в концентрациях 1пг-10нг/мл. (а-г) - эксплантатами хрящей четырех ОА пациентов указанного возраста и пола, (д) - усредненные данные для всех четырех пациентов, (е) - ПГЕ2 в концентрации 10пг/мл в эксплантатах 13 ОА пациентов, (ж) - зависимость между концентрацией ПГЕ2 и активностью расщепления коллагена в эксплантатах ОА хрящей, используемых в качестве контроля. Расщепления коллагена 2 типа тестировали по изменению в среде концентрации карбокси-терминального эпитопа (C1,2C), являющегося маркером его расщепления коллагеназой. Статистически значимые различия по сравнению с контролем обозначены звездочками.

далось при 10пг/мл ПГЕ2 (рис.1а,в,г), а также в большей выборке из 13 пациентов (рис.1е). При этом в среднем ингибирование расщепления коллагена ПГЕ2 в концентрации 10пг/мл составляло 39,7% (вариации 33,5-49,8 %) и было сопоставимо по эффективности с ТРФ $\beta$ 2 (40,1%; при вариации 26,9-49,4 %). Интересно, что при более высоких концентрациях (0,1-10нг/мл) это ингибирование отсутствовало, а в одном случае наблюдалось стимулирование расщепления коллагена (рис.1б).

Мы также наблюдали обратно-пропорциональную зависимость между концентрацией ПГЕ2 и активностью расщепления коллагена в эксплантатах хрящей больных ОА, которые использовались в качестве контролей. При этом более низкая активность расщепления коллагена наблюдалась в эксплантатах хрящей больных ОА с высокими уровнями секреции ПГЕ2 (коэффициент корреляции  $r = -0,507$ ;  $p = 0,044$ ) (рис. 1ж).

#### Освобождение протеогликанов в эксплантатах, культивируемых в присутствии ПГЕ2

Подавление расщепления коллагена не сопровождалось значительными изменениями в освобождении ГАГ в эксплантатах, культивируемых в присутствии 10пг/мл ПГЕ2 (рис.2). Между тем ТРФ $\beta$ 2 значительно увеличивал освобождение ГАГ в 3 из 4 исследованных образцах хряща.

### Изменения экспрессии генов в эксплантатах ОА хрящей, культивируемых в присутствии ПГЕ2

В эксплантатах хрящей 5 больных ОА при их культивировании в присутствии 10 пг/мл ПГЕ2 наблюдалось существенное снижение расщепления коллагена. Анализ экспрессии генов в этих эксплантатах показал значительное снижение экспрессии COL10A1 гена, связанного с гипертрофией хондроцитов, а также ММП-13 по сравнению с контрольными эксплантатами (рис.3). Экспрессия коллагеназы ММП-1 была также значительно снижена у 4 из 5 пациентов. Цитокины наиболее сильно ингибировались простагландином, и в ряде случаев в присутствии ПГЕ2 экспрессия ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  была полностью подавлена. Между тем экспрессия циклина В2, каспазы 3, TRF $\beta$ 2, COX2 и ПГЕС-1 не изменялась значительно в присутствии 10 пг/мл ПГЕ2 (данные не приводятся).

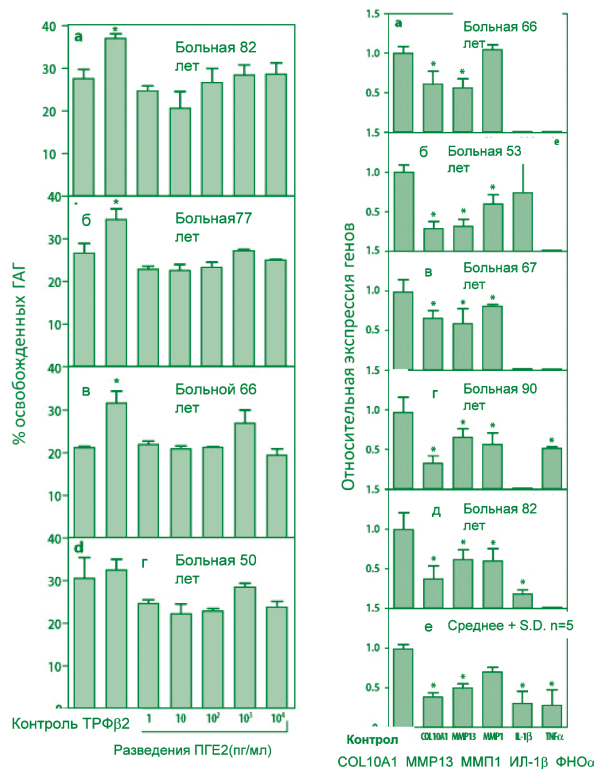


Рисунок 2

Влияние TRF $\beta$ 2 (5 нг/мл) и ПГЕ2 в концентрациях 1 нг-10 нг/мл на освобождение протеогликанов эксплантатами хряща больных ОА. Статистически значимые различия по сравнению с контролем обозначены звездочками.

### Ингибитор циклооксигеназы может частично противодействовать влиянию TRF $\beta$ 2 на расщепление коллагена

Известно, что напрокссен способен ингибировать COX-1 и -2 [21]. В дополнение к нашим предшествующим исследованиям по влиянию TRF $\beta$ 2 и ПГЕ2 на активность расщепления коллагена, мы изучили воздействие неселективного COX ингиби-

тора-напрокссена на освобождение C1,2C эпитопов. Мы предположили, что ингибитор может противодействовать влиянию TRF $\beta$ 2 на расщепление коллагена. В 2-х (рис.4а и б) из 3-х эксплантатов хряща при фармакологических [22] концентрациях в 5 мкг/мл и 10 мкг/мл напрокссен действительно противодействовал ингибирующему влиянию TRF $\beta$ 2 на расщепления коллагена, и только в одном случае (рис.4в) этого эффекта не наблюдалось. Между тем в супер-фармакологических концентрациях (30 мкг/мл) препарат не был способен противодействовать ингибированию TRF $\beta$ 2 разрушения хряща. В эксплантатах хряща, культивируемых исключительно с напрокссеном, наблюдали значительное увеличение расщепления коллагена по сравнению с контролем у 2 из 3 пациентов при концентрации ингибитора 5 мкг/мл (рис.4а,б).

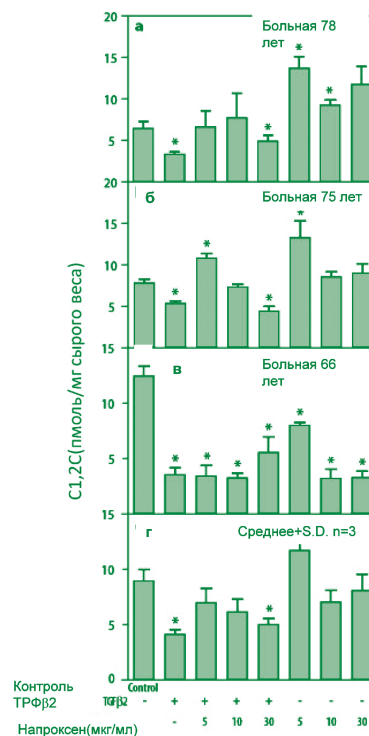


Рисунок 4

Влияние напрокссена (5, 10 или 30 мкг/мл) на активность расщепления коллагена эксплантатами хряща больных ОА при их культивировании в присутствии или отсутствии 5 нг/мл TRF $\beta$ 2. Указан возраст и пол больных. Расщепления коллагена 2 типа тестировали по изменению в среде концентрации карбокси-терминального эпитопа (C1,2C), являющегося маркером его расщепления коллагеназой. Статистически значимые различия по сравнению с контролем обозначены звездочками.

### Обсуждение

Простагландины принимают участие в регуляции различных физиологических процессов, включая мужскую плодовитость, менструации, овуляцию, беременность, а также в патологических процессах при воспалительных заболеваниях, таких как артриты, и неоплазиях [4]. Однако также имеются сведения о потенциальном патологическом действии ПГЕ2 на суставной хрящ [7,23].

Наши исследования доказывают, что в низких концентрациях (10 пг/мл) ПГЕ2 способен селективно ингибировать активность расщепления коллагена в эксплантатах хрящей больных ОА. Это сопровождалось подавлением экспрессии коллагеназ ММП-1 и ММП-13, цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$ , а также COL10A1, являющийся маркером гипертрофии хондроцитов.

Ранее было показано, что ПГЕ2 подавляет гипертрофию хондроцитов при эмбриональном развитии [24, 25]. В данном исследовании мы обнаружили, что ПГЕ2 также ингибирует гипертрофию хондроцитов суставного хряща у больных ОА, что сопровождается подавлением разрушения коллагена.

При ингибировании разрушения коллагена посредством ТРФβ2 в эксплантатах хрящей больных ОА ПГЕ2 может служить посредником, поскольку при этом происходит увеличение синтеза ПГЕ2 [3]. Кроме того, принимая во внимание ингибирующее действие напроксена, блокатора циклооксигеназы, который также оказался способным противодействовать хондропротективному действию ТРФβ2 на деградацию коллагена в хрящах больных ОА, можно заключить, что ПГЕ2 является медиатором хондропротективного действия ТРФβ2 в хряще больных ОА. Поэтому полученные результаты подтверждают наше предположение о том, что ПГЕ2 может опосредовать ингибирующее действие ТРФβ2 на деградацию коллагена в хряще больных ОА [3].

Ингибирование ПГЕ2 происходило только в концентрациях, значительно ниже присутствующих при воспалительном процессе [7]. Ранее сообщалось, что ПГЕ2 ответствен как за катаболические, так и за анаболические изменения в суставном хряще [6,7]. Он способен ингибировать синтез коллагена хондроцитами ростковой пластинки [26], опосредовать продукцию ММП в суставных хондроцитах и хряще [6, 27], ингибировать пролиферацию хондроцитов [28], усиливать экспрессию ИЛ-1β [29] и индуцировать апоптоз [30]. Напротив, он также может ингибировать экспрессию коллагеназы и стромелизина [9,10,31,32], ИЛ-1β и ФНОα [32], стимулировать синтез коллагена и протеогликана [11-13], пролиферацию хондроцитов [11], ингибировать гипертрофию хондроцитов [24,25] и апоптоз в клетках эндотелия [33].

Следует подчеркнуть, что результаты воздействия ПГЕ2 на хондроциты могут зависеть от дозы агента [9,34]. Наша экспериментальная система, содержащая 10пг/мл ПГЕ2, оказывала хондропротективное действие в эксплантатах суставного хряща больных ОА, подавляя расщепление коллагена и экспрессию генов, связанных с этим расщеплением, про-воспалительных цитокинов и гипертрофию хондроцитов. При этом в наших исследованиях ПГЕ2 не усиливал пролиферацию хондроцитов, апоптоз, синтез коллагена 2 типа и простагландинов, о чем свидетельствует отсутствие существенных изменений в уровне экспрессии циклина В2, каспазы 3, коллагена 2 типа (COL2A1), СОХ-2 и ПГЕС-1, соответственно.

Однако в настоящее время причины хондропротекторных свойств исключительно низких доз ПГЕ2 до конца неясны. Можно лишь сделать следующее предположение. Активное расщепление коллагена в хрящах больных ОА приводит к образованию в матриксе хряща фрагментов коллагена, которые спо-

собны индуцировать металлопротеиназы, а также синтез цитокинов ФНОα и ИЛ-1β [36]. Цитокины в свою очередь могут стимулировать продукцию ПГЕ2 [5]. Этим объясняются высокие уровни спонтанной продукции ПГЕ2 в эксплантатах хряща больных ОА [6]. Наши данные свидетельствуют о существовании обратно-пропорциональной зависимости между концентрацией ПГЕ2 в среде и активностью расщепления коллагена (рис.1ж). Низкая концентрация ПГЕ2 (10пг/мл) в свежей среде, вероятно, блокировала расщепление коллагена, ингибируя экспрессию и продукцию металлопротеиназ матрикса и, следовательно, развитие цепной реакции продукции цитокинов, стимулирующих освобождение ПГЕ2 в среду. Кроме того, активное расщепление коллагена всегда сопровождает процессы дифференциации хондроцитов, которые наблюдаются в хряще больных ОА [2]. Поэтому ингибирование расщепления коллагена приводило к подавлению экспрессии маркера терминальной дифференциации хондроцитов — коллагена 10 типа.

Наконец, важно отметить, что в физиологических концентрациях как ТРФβ2 [3], так и ПГЕ2 способны восстанавливать фенотип хондроцитов, близкий к нормальному, который характеризуется низкой скоростью деградации коллагена, низким уровнем экспрессии коллагена 2 типа и апоптозной активности, отсутствием экспрессии коллагена 10 типа, металлопротеиназ матрикса, цитокинов ФНОα и ИЛ-1β, а также ряда факторов роста [1,2]. Кроме того в низких концентрациях ПГЕ2 может также усиливать процесс костеобразования, поскольку способствует увеличению активности щелочной фосфатазы, ключевого медиатора дифференциации остеобластов [34,35]. Поэтому полученные результаты ставят под сомнение необходимость полного ингибирования циклооксигеназы ввиду протективного действия очень низких концентраций ПГЕ2.

### Заключение

Таким образом, ПГЕ2 в низкой концентрации способен ингибировать разрушение коллагена суставного хряща, экспрессию провоспалительных цитокинов и подавлять гипертрофию хондроцитов при ОА. При этом ПГЕ2, вероятно, является медиатором хондропротективного действия ТРФβ2, поскольку простагландин продуцируется под действием этого ростового фактора, а при добавлении в физиологических концентрациях оба соединения способны модифицировать *in vitro* фенотип хондроцитов больных ОА, приближая его к фенотипу хондроцитов здоровых людей. В связи с этим при ингибировании циклооксигеназы СОХ- ингибиторами следует контролировать остаточное количество ПГЕ2, необходимое для сохранения регенеративного потенциала суставного хряща при ОА.

# ЛИТЕРАТУРА

1. Poole A.R. Cartilage in health and disease. In *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, 15<sup>th</sup> Edition, Edited by Koopman WJ, Moreland LW. Baltimore:Williams & Wilkins; 2005, 223-69.
2. Tchetina E.V., Squires G., Poole A.R. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with the upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J. Rheumatol.*, 2005, 32, 876-86.
3. Tchetina E.V., Antoniou J., Tanzer M., et al. Transforming growth factor –  $\beta$ 2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin  $E_2$  production. *Am. J. Pathol.*, 2006, 168, 131-40.
4. Luo C., He M-L., Bohlin L. Is COX-2 a perpetrator or a protector? Selective COX-2 inhibitors remain controversial. *Acta Pharmacol. Sinica*, 2005, 26, 926-33.
5. Knott I., Dieu M., Burton M., et al. Induction of cyclooxygenase by interleukin 1: Comparative study between human synovial cells and chondrocytes. *J. Rheumatol.*, 1994, 21, 426-36.
6. Amin A.R., Attur M., Patel R.N., et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J. Clin. Invest.*, 1997, 99, 1231-7.
7. Martel-Pelletier J., Pelletier J-P., Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Seminars Arthritis Rheum.*, 2003, 33, 155-67.
8. Gilroy D.W., Colville-Nash P.R., Willis D., et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.*, 1999, 5, 698-701.
9. DiBattista J.A., Martel-Pelletier J., Fujimoto N., et al. Prostaglandins  $E_2$  and  $E_1$  inhibit cytokine-induced metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signaling pathway. *Lab. Invest.*, 1994, 71, 270-8.
10. Salvatory R., Guidon P.T., Rapuano B.E., et al. Prostaglandin  $E_1$  inhibits collagenase gene expression in rabbit synoviocytes and human fibroblasts. *Endocrinol.*, 1992, 131, 21-8.
11. Lowe G.N., Fu Y.H., McDougall S., et al. Effects of prostaglandins on deoxyribonucleic acid and aggrecan synthesis in the RCJ 3.1C5.18 chondrocyte cell line: Role of second messengers. *Endocrinol.*, 1996, 137, 2208-16.
12. DiBattista J.A., Dore S., Martel-Pelletier J., et al. Prostaglandin  $E_2$  stimulates incorporation of proline into collagenase digestible proteins in human articular chondrocytes: identification of an effector autocrine loop involving insulin-like growth factor 1. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1996, 123, 27-35.
13. Mastbergen S.C., Jansen N.W.D., Bijlisma J.W.J., et al. Differential direct effects of cyclo-oxygenase-1/2 inhibition on proteoglycan turnover of human osteoarthritic cartilage:an in vitro study. *Arthritis Res. Ther.*, 2006, 8, R2 (doi:10.1186/ar1846).
14. DiBattista J.A., Martel-Pelletier J., Cloutier J.M., et al. Modulation of glucocorticoid receptor expression in human articular chondrocytes by cAMP and prostaglandins. *J. Rheumatol.*, 1991, 27, 102-5.
15. Altman R., Asch E., Bloch D., et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.*, 1986, 29, 1039-149.
16. Billingham R.C., Dahlberg L., Wu W., et al. Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. *Arthritis Rheum.*, 2000, 43, 664-72.
17. Billingham R.C., Dahlberg L., Ionescu M., et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J. Clin. Invest.*, 1997, 99, 1534-45.
18. Dahlberg L., Billingham R.C., Manner P., et al. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). *Arthritis Rheum.*, 2000, 43, 673-82.
19. Farndale R.W., Buttle G.J., Barrett A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 883, 173-77.
20. Rizkalla G., Reiner A., Bogoch E., et al. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and arthritis: evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J. Clin. Invest.*, 1992, 90, 2268-77.
21. Pairet M., Churchill L., Engelhardt G. Differential inhibition of cyclooxygenase 1 and 2 by NSAIDS. In *New Targets of Inflammation: Inhibitors of COX-2 and Adhesion Molecules*, Edited by Bazan N, Botting J, Vane J. Hingham, MA, Kluwer Academic Publishers; 1996, 23-46.
22. DiBattista J.A., Pelletier J-P., Ranger P., et al. Modulation of the expression of glucocorticoid receptors in synovial fibroblasts and chondrocytes by prostaglandins and NSAIDS. *Am. J. Therap.*, 1995, 2, 369-73.
23. Aoyama T., Liang B., Okamoto T., et al. PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.*, 2005, 20, 377-89.
24. Li T-F., Zuscik M.J., Ionescu A.M., et al. PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. *Exp. Cell Res.*, 2004, 300, 159-69.
25. Zhang X., Ziran N., Goater J.J., et al. Primary murine limb bud mesenchymal cells in long-term culture complete chondrocyte differentiation: TGF- $\beta$  delays hyper-

- trophy and PGE2 inhibits terminal differentiation. Bone, 2004, 34, 809-17.*
26. O'Keefe R.J., Crabb I.D., Puzas J.E., et al. Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J. Bone Miner. Res.*, 1992, 7, 397-404.
  27. Bunning R.A., Russell R.G. The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.*, 1989, 32, 780-4.
  28. Blanco F.J., Lotz M. IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Exp. Cell Res.*, 1995, 218, 319-25.
  29. Lorenz J.J., Furdon P.J., Taylor J.D., et al. A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal is required for the induction of IL-1 beta by TNF-alpha in human monocytes. *J. Immunol.*, 1995, 155, 836-44.
  30. Miwa M., Saura R., Hirata S., et al. Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E2 through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthr. Cartil.*, 2000, 8, 17-24.
  31. Tung J.T., Arnold C.E., Alexander L.H., et al. Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinases 1, 3 and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. *Am. J. Vet. Res.*, 2002, 63, 987-93.
  32. Faour W.H., He Q., Mancini A., et al. Prostaglandin E2 stimulates p53 transactivational activity through specific serine 15 phosphorylation in human synovial fibroblasts: role in suppression of c/EBP/NF- $\kappa$ B-mediated MEKK1-induced MMP-1 expression. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 19849-60.
  33. Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metast. Rev.*, 2000, 19, 19-27.
  34. Schwartz Z., Gilley R.M., Sylvia V.L., et al. The effect of prostaglandin E2 on costochondral chondrocyte differentiation is mediated by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase C. *Endocrinol.*, 1998, 139, 1825-34.
  35. Watkins B.A., Li Y., Seifert M.F. Nutraceutical fatty acids as biochemical and molecular modulators of skeletal biology. *J. Am. College Nutr.*, 2001, 20, 410S-6S.
  36. Yasuda T., Tcheta E., Ohsawa K., et al. Peptides of type II collagen can induce the cleavage of type II collagen and aggrecan in articular cartilage. *Matrix Biol.*, 2006, 25, 419-29.

Поступила 13.11.08

# Abstract

**E.V. Chetina, D. DiBatista, A.R. Pul**

## **Prostaglandin E2 role in inhibition of articular cartilage collagen degradation in patients with osteoarthritis.**

**Objective.** To assess prostaglandin E2 (PGE2) role in inhibition of type II collagen digestion in explants of articular cartilage of pts with osteoarthritis (OA).

**Material and methods.** Explants of articular cartilage of pts with OA were cultured with PGE2 1pg to 10 ng/ml. Type II collagen digestion was assessed with immuno-enzyme assay. Gene expression was evaluated with PCR in real time.

**Results.** PGE2 10 pg/ml as well as transforming growth factor  $\beta$ 2 (TGF $\beta$ 2) suppressed type II collagen digestion in explants of articular cartilage of pts with OA. This concentration of PGE2 did not suppress proteoglycan (aggrecan) degradation. Gene expression analysis in 5 OA pts showed that PGE2 10 pg/ml suppressed metalloproteinase (MMP)-13, MMP-1 and marker of chondrocyte hypertrophy type X collagen (COL10A1) as well as proinflammatory cytokines interleukine (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ . Naproxen, nonselective cyclooxygenase(COX)-2 and 1 inhibitor concentration from 5 to 30 mcg/ml blocked TGF $\beta$ 2 induced collagen digestion inhibition proving that PGE2 mediate influence of this growth factor. Naproxen concentration 5 mcg/ml increased collagen degradation.

**Conclusion.** The study showed that PGE2 is a chondroprotector because it is able to suppress selectively OA pts cartilage collagen degradation. Beside that cartilage chondrocyte hypertrophy in OA connected functionally with increased collagen digestion is also regulated by low concentrations of PGE2

**Key words:** osteoarthritis, articular cartilage, type II collagen degradation, prostaglandin E2, gene expression, naproxen