

Е.В. Четина

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт ревматологии РАМН, Москва

АКТИВАЦИЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ МАТРИКСА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ХОНДРОЦИТОВ, СОПРОВОЖДАЮЩАЯ ИНДУКЦИЮ РАСЩЕПЛЕНИЯ КОЛЛАГЕНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОЛЛАГЕНОВОГО ПЕПТИДА В ХРЯЩЕ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Контакты: Елена Васильевна Четина etchetina@mail.ru

Цель. Изучить влияние пептида коллагена 2-го типа (CB12-2), способного индуцировать расщепление коллагена в эксплантатах хряща коленного сустава, активирующее матриксную металлопротеиназу (ММП) и дифференцировку суставных хондроцитов.

Материал и методы. Эксплантаты хрящей человека культивировали в присутствии CB12-2 (аминокислотные остатки 195–218) в концентрации 10 мкМ. Расщепление коллагена 2-го типа оценивали, используя иммуноферментный анализ. Для иммуногистохимического анализа коллагена 10-го типа (COL10A1) использовали криосрезы хряща. Апоптотическую активность измеряли методом концевой мечености в области разрыва по dUTP терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TUNEL). Экспрессию генов определяли посредством полуквантитативной полимеразной цепной реакции, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Результаты. При высоких, но встречающихся в природе концентрациях (10 мкМ) CB12-2 индуцировал расщепление коллагена 2-го типа коллагеназой в эксплантатах хряща здорового человека. Пептид индуцировал увеличение экспрессии ММП 13, 1, 9, MT1-ММП, а также генов, ассоциированных с дифференцировкой эмбриональных хондроцитов в ростковой пластинке, — трансформирующего фактора роста (TGF) $\beta 1/2$, 9-го бокса, определяющего половую область Y (Sox9), индийского ежика (Ihh), пептида, родственного паратиреоидному гормону (PTHrP), фактора роста фибробластов (FGF) 2; маркера пролиферации циклина B2 и цитокинов фактора некроза опухоли (ФНО) α и интерлейкина (ИЛ) 1 β . При этом повышение экспрессии маркера гипертрофии хондроцитов — COL10A1 — сопровождалось усилением окрашивания на коллаген 10-го типа на криосрезе хряща, а при повышении экспрессии маркера апоптоза — каспазы 3 — увеличивалось количество TUNEL-положительных клеток в поверхностной зоне хряща.

Заключение. В настоящем исследовании показано, что индукция коллагеназной активности в присутствии CB12-2 в хондроцитах суставного хряща человека сопровождается терминальной дифференцировкой/гипертрофией этих клеток. Терминальная дифференцировка хондроцитов может быть одним из механизмов разрушения хряща при остеоартрозе, поскольку происходит естественным путем не только при эндохондральной оссификации, но и при развитии патологии.

Ключевые слова: суставной хрящ, экспрессия генов, гипертрофия хондроцитов, коллагеназа, коллаген 2-го типа, пептид

THE ACTIVATION OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND CHONDROCYTE DIFFERENTIATION, WHICH ACCOMPANIES THE INDUCTION OF COLLAGEN DECOMPOSITION UNDER THE ACTION OF COLLAGEN PEPTIDE IN THE CARTILAGE OF HEALTHY INDIVIDUALS

E. V. Chetina

Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Contact: Elena Vasilyevna Chetina etchetina@mail.ru

Objective: To study the effect of type II collagen peptide (CB12-2) that is able to induce the collagen decomposition in the knee articular cartilage explants, which activates matrix metalloproteinase (MMP) and articular chondrocyte differentiation.

Material and methods. Human cartilage explants were cultured in the presence of CB12-2 (amino acid residues 195–218) at a concentration of 10 μ M. Type II collagen decomposition was evaluated by enzyme immunoassay. Immunohistochemical assay of type X collagen (COL10A1) used frozen cartilage sections. Apoptotic activity was measured by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling method (TUNEL). Gene expressions were determined by semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results. CB12-2 at high, but naturally occurring concentrations (10 μ M) induced type II collagen decomposition by collagenase in the cartilage explants from a healthy individual. The peptide caused an increase in the expression of MMP 13, 1, 9, MT1-MMP, and the genes associated with the differentiation of embryo chondrocytes in the growth plate — transforming growth factor (TGF) $\beta 1/2$, sex-determining region Y-box 9 (Sox9), Indian hedgehog (Ihh), parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), fibroblast growth factor (FGF-2); a marker for proliferation of cyclin B2 and cytokines of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β). At the same time the increased expression of the chondrocyte hypertrophy marker COL10A1 was accompanied by enhanced staining for type X collagen in the frozen cartilage sections whereas the number of TUNEL-positive cells increased in the cartilage surface area as the expression of the apoptotic marker caspase 3 became higher.

Conclusion. This study has shown that the induction of collagenase activity by CB12-2 in the human articular cartilage chondrocytes is attended by terminal differentiation/hypertrophy of these cells. The terminal differentiation of chondrocytes may be one of the mechanisms of chondrolysis in osteoarthritis since it naturally occurs not only in endochondral ossification, but also in the development of pathology.

Key words: articular cartilage, gene expression, chondrocyte hypertrophy, collagenase, type II collagen, peptide

Остеоартроз (ОА) характеризуется деградацией суставного хряща, при которой происходит разрушение внеклеточного матрикса (ВКМ). Последнее включает повышение активности расщепления коллагена 2-го типа коллагеназами [1] и денатурацию этих молекул с экспонированием скрытых эпитопов [2], которые могут иметь определенную биологическую активность. Продукты деградации молекул матрикса могут также влиять на хондроциты и индуцировать как анаболические, так и катаболические процессы в хряще.

Мы недавно показали, что пептид коллагена 2-го типа, состоящий из 24 аминокислот (CB12-2), может активизировать расщепление коллагена 2-го типа коллагеназой в эксплантатах бычьего суставного хряща [3]. При этом разрушение коллагена пептидом сопровождается активацией генов, участвующих в дифференцировке хондроцитов ростковой пластинки и ответственных за пролиферацию, экспрессию коллагена 10-го типа [4], аннексинов и щелочной фосфатазы, пептида, родственного паратироидному гормону (PTHrP), кальцификацию матрикса и апоптоз терминально дифференцированных хондроцитов [5].

В других наших исследованиях было показано, что образование ранних фокальных ОА-подобных повреждений хряща коленного сустава человека также характеризуется усиленным расщеплением коллагена 2-го типа и сопровождается экспрессией генов, связанных с гипертрофией хондроцитов [6]. Это позволило предположить, что дифференцировка хондроцитов суставного хряща может происходить на ранней стадии развития ОА, а расщепление коллагена может регулироваться теми же факторами, которые используются при дифференцировке хондроцитов ростковой пластинки. Это подтверждается результатами наших недавних исследований [7], показавших, что как разрушение коллагена в суставном хряще при ОА, так и экспрессию генов, характерных для гипертрофной фазы дифференцировки хондроцитов, можно ингибировать действием факторов роста, которые способны подавлять гипертрофию хондроцитов ростковой пластинки [8].

В данной работе мы показываем, что пептид коллагена 2-го типа (CB12-2) способен индуцировать экспрессию матриксной металлопротеиназы (ММП) 13 и опосредованное коллагеназой расщепление коллагена 2-го типа, которое сопровождается манифестацией гипертрофных изменений в хондроцитах здорового хряща человека. Более того, изменения, индуцируемые CB12-2, ингибируются смесью факторов роста, способных подавлять гипертрофию хондроцитов ростковой пластинки.

Материал и методы

Подготовка суставного хряща

Суставной хрящ дистальной части бедренной кости здоровых людей получали не позднее чем через 16 ч после их скоростной смерти в результате автомобильной аварии. В исследовании использовали хрящи 3 индивидов мужского пола 26, 48 и 57 лет. Исследования хрящей этих людей показали сходные результаты, поэтому приведены данные, полученные для одного из них.

Хрящи готовили по общепринятой методике [1]. Хрящи 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_3 ; 100 ед/мл пенициллина; 100 ед/мл стрептомицина и 150 мкг/мл гентамицина сульфата. Суставной хрящ, срезанный с кости, разрезали на кубики размером 2×2×2 мм. 50–70 мг

(5–7 кубиков) предварительно культивировали на планшетах (48 лунок от Costar 3548) в течение 48 ч при 37 °C в 1 мл ДМЕМ-А в атмосфере 95% воздуха и 5% CO_2 .

Культивирование хрящевых эксплантатов

Среду меняли через 48 ч (следующий после смены среды день считали началом опыта, день 0), а затем — через каждые 4 дня. В работе использовали синтетический пептид, описанный нами ранее [3] и представляющий собой фрагмент коллагена 2-го типа (аминокислотные остатки 195–218) GERGPP*GPQGARGFP*GTP*GLP*GVK (где * означает оксипролин). Пептид CB12 добавляли в среду также при каждой ее смене в концентрации 10 мкМ.

Хрящи (каждый опытный вариант в 3 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. Для анализа экспрессии генов эксплантаты культивировали 1, 4, 8 и 12 дней и анализировали, как описано ниже.

Для проверки присутствия эндотоксина в препаратах пептида CB12-2 использовали набор для определения эндотоксина (Sigma). При этом оказалось, что найденные уровни эндотоксина 1–2 нг/мл значительно ниже концентраций (1,0 мкг/мл), необходимых для индукции разрушения хряща [9].

Определение активности расщепления коллагена 2-го типа коллагеназой с использованием фермент-зависимого иммуносорбентного метода (ELISA)

После 16 дней культивирования эксплантаты хрящей экстрагировали α -химотрипсином, чтобы перевести в раствор, не переваривая, денатурированный коллаген, включая карбокситерминальный неопитоп COL2-3/4C (C1,2C), образуемый при расщеплении коллагена 2-го типа коллагеназой. Его содержание в культуральной среде и α -химотрипсином экстракте хряща определяли посредством ELISA [3]. Суммарный неопитоп расщепления в хряще и среде рассчитывали суммированием данных анализа каждого образца среды и экстракта хряща. Результаты выражали в пикомолях эпитопа на 1 мг сырой массы хряща. Молекулярная масса стандартного пептида эпитопа равна 608 Да.

Подготовка криосрезов хряща. Фрагменты хряща человека в конце культивирования замораживали в ОСТ-реагенте и готовили срезы толщиной 7,5 мкм с использованием криостата. Далее эти срезы фиксировали 5 мин в 4% растворе параформальдегида, отмывали фосфатно-солевым раствором (PBS) в течение 15 мин и блокировали непрореагировавшие альдегидные группы в растворе с 1% нормальной кроличьей сывороткой в PBS в течение 15 мин. Активность эндогенной пероксидазы блокировали инкубированием срезов в свежеприготовленном 0,5% растворе H_2O_2 в абсолютном метаноле в течение 10 мин. Для увеличения проницаемости внеклеточного матрикса хондроитин сульфат удаляли обработкой срезов хондроитиназой ABC (ICN/Flow Laboratories) с активностью 0,0125 ед/50 мкл на один срез в 0,1 М трис-ацетатном буфере с pH 7,6 в течение 90 мин при 37 °C во влажной камере. После 3-кратной отмывки по 15 мин в PBS срезы инкубировали в растворе 0,2 М ЭДТА в 50 мМ Трис-HCl буфере при pH 7,6 в течение 1 ч при комнатной температуре для удаления всех кальциевых отложений в образцах. Далее срезы отмывали 15 мин в PBS, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA).

Локализация коллагена 10-го типа

Срезы инкубировали 30 мин при комнатной температуре во влажной камере с добавлением по 50 мкл на срез разве-

денного раствора моноклональных антител домена NCI коллагена 10-го типа [10] (асцитная жидкость, разведенная 1:100) или, в качестве контроля, с неиммунной асцитной жидкостью, каждый из которых разводили PBS, содержащим 1% в/о BSA. Другим специфическим контролем служила преадсорбция разведенных антител соответствующим им иммунизирующим пептидом. Срезы отмывали PBS, содержащим 0,1% в/о BSA, 3 раза по 10 мин. Систему детекции биотин-стрептавидин (Amersham) использовали в соответствии с рекомендациями производителя. Эта система состояла из кроличьих антимышинных меченных биотином $F(ab')_2$ иммуноглобулинов (Ig) и стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой в качестве индикатора. Биотинилированные антимышинные $F(ab')_2$ кролика разводили в PBS, содержащем 1% в/о BSA, добавляли по 50 мкл на срез и инкубировали в течение 30 мин. После отмывания в не содержащем азид PBS срезы обрабатывали по 50 мкл на срез разведенным стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой в не содержащем азид PBS с 1% BSA в течение 20 мин при комнатной температуре. После развития пероксидазной реакции продукт усиливали, используя метод медно- H_2O_2 /серебряной интенсификации [11]. Далее готовили перманентные препараты.

Выявление апоптотных клеток

Для выявления клеток, погибших в результате апоптоза, использовали систему TUNEL (Roche Diagnostics) в соответствии с инструкциями производителя. При этом на участках однонуклеотидных разрывов (nicks), производи-

мых терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазой (TdT), dUTP метили флюоресцеином. Для этого использовали криосрезы хряща человека, приготовленные как описано выше. Разведения реагентов, предварительную обработку и условия проявления тщательно отработывали во избежание ложноположительных результатов. Для этой цели использовали продольные срезы эмбриональной ростковой пластинки быка, где в поздней гипертрофной фазе хондроциты погибают вследствие апоптоза и могут служить положительным контролем, а прегипертрофные хондроциты — отрицательным контролем.

Для пермеабилзации клеток срезы инкубировали в 1x IC Perm-буфере, содержащем 0,1% сапонина (BioScience International), в течение 1 ч на льду. После этого проводили TUNEL-реакцию. Ядра окрашивали бромистым этидием в концентрации 25 мкг/мл в 5% в/о ЭДТА в дистиллированной воде, содержащей 0,005% азид натрия в качестве консерванта. Тканевые срезы окрашивали в течение 2 мин и отмывали дистиллированной водой в течение 5 мин. Срезы фиксировали с использованием реагента Vestashield Mounting Medium H-1000 (Vector). Флюоресцентные метки детектировали с использованием флюоресцентного микроскопа.

Выделение общей РНК, обратная транскрипция (ОТ)

РНК выделяли из эксплантатов ОА хрящей после их культивирования в течение 1, 4, 8 или 12 дней по общепринятой методике [7]. В реакции обратной транскрипции ис-

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованные в работе

Коллагеназа 3 (ММП 13): D(1241–1259)GATAAAGACTATCCGAGAC, R(1369–1386) GAGTAACCGTATTGTTCCG

Мембранного типа 1 ММП (MT1-ММП): D(833–850) GCATCCAGCAACTTTATG, R(951–970) CATCTGTGACGGGAACCTTG

ММП 1: D(1095–1114) CA AAGGGAATAAGTACTGGG, R(1211–1232) CTGAGGAAAACACTGGAAAAAC

Желатиназа В (ММП 9): D(139–156) GCAGAGGAATACCTGTAC, R(361–377) CACAACATCACCTACTG

Коллаген 10-го (X) типа (COL10A1): D(213–232) CTGAGCGATACCAACACC, R(297–319) GTAAAGGTGTATCACTGAGAGG

Циклин В2: D(932–949) GTTGACTATGACATGGTG; R(1272–1290) GTTCGTGCACTTTGTCTTG

Трансформирующий ростовой фактор $\beta 1$ (TGF $\beta 1$): TGF $\beta 1$ -D(126–143) GGCAACAAAATCTATGAC, TGF $\beta 1$ -R(471–490) CTTCAAGTGGACATTAACGG

Трансформирующий ростовой фактор $\beta 2$ (TGF $\beta 2$): TGF $\beta 2$ -D(943–962) GATTGACGTCTCAGCAATG, TGF $\beta 2$ (1324–1343) CATATACCAGTGGTGATCAG

Indian hedgehog (Ihh): IHH-D(476–494) CAGGTCATCGAGACTCAGG, IHH-R(773–789) GCTCAGTTGGCCTTCTG

Основной ростовой фактор фибробластов (bFGF, FGF-2): bFGF-D(975–994) GGCACACATTAATCTACATG, bFGF-R(1262–1282) CCACTCACACTTTAAGCATTC

Пептид, родственник паратироидному гормону (PTHrP): PTHrP-D(233–253) GAAATCAGAGCTACCTCGGAG; PTHrP-R(317–336) GATGAGGGCAGATACCTAAC

Sox-9: Sox9-D(21–39) CATGAAGATGACCGACGAG, Sox9-R(283–303) GTCAACGGCTCGAGCAAGAAC

Каспаза 3: D(262–282) CTGGTACAGATGTGATGCAG; R(581–600) CATTGAGACAGACAGTGGTG

Интерлейкин 1 β (ИЛ 1 β): D(710–728) GGAAAAGCGATTTGTCTTC, R(844–863) GCCAGGATATAACTGACTTC

Фактор некроза опухоли α (ФНО α): D(633–650) GTCTCCTACCAGACCAAG, R(816–837) GAGTCTGGGCAGGTCTACTTTG

Глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH): G3PDH-D(605–628) GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC, G3PDH-R(927–950) AGCTCATTTCTGGTATGAC

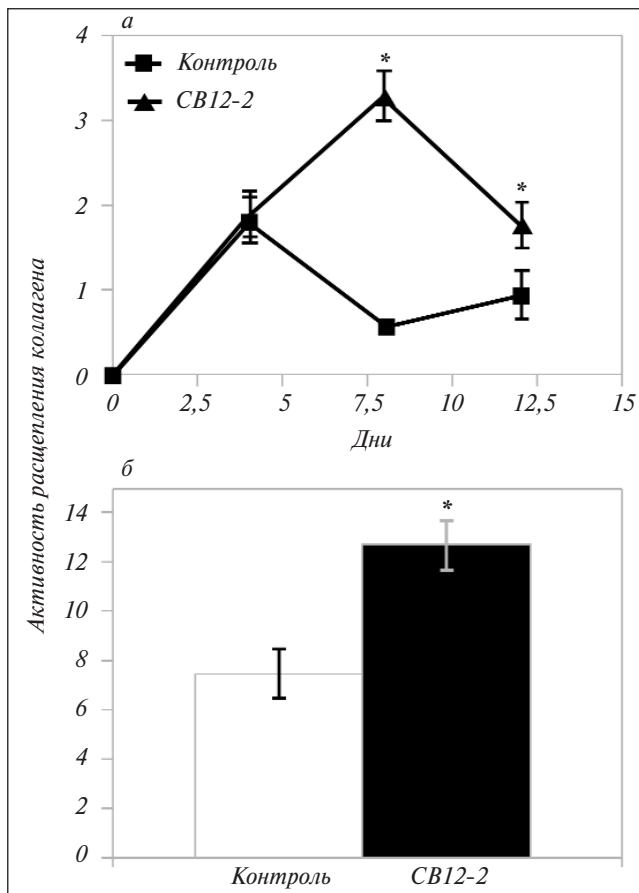


Рис. 1. Индукция активности расщепления коллагена 2-го типа в среде (а) и при объединении среды и хряща (б) в эксплантатах хряща здорового мужчины 26 лет

пользовали суммарную РНК хряща и проводили ее по общепринятой методике [7].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованные в работе, представлены в табл. 1. ПЦР проводили как описано ранее [7]. GAPDH (глицеральдегидфосфат дегидрогеназа) использовали в качестве эндогенного контроля. Используя серийные разведения сДНК при амплификации, следили, чтобы интенсивность полос на геле не превышала уровень насыщения. Для предотвращения вариаций по эффективности в разных экспериментах во всех образцах одновременно проводили ОТ и амплифицировали в ПЦР.

Статистический анализ

Данные количественных экспериментов представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартная вариация. Анализы проводили в 3 повторностях. Тест на нормальность показал, что результаты соответствовали кривой распределения Гаусса. Для статистической обработки результатов использовали тесты Манна–Уитни и парный тест Стьюдента (t-тест). Значения вероятности ошибки $<0,05$ считались достоверными.

Результаты

Индукция расщепления коллагена 2-го типа под действием пептида CB12-2. Ранее мы показали, что CB12-2 способен индуцировать расщепление коллагена коллагеназой в эксплантатах хряща взрослых быков [3]. Для проверки, оказывает ли данный пептид аналогичное действие на хря-

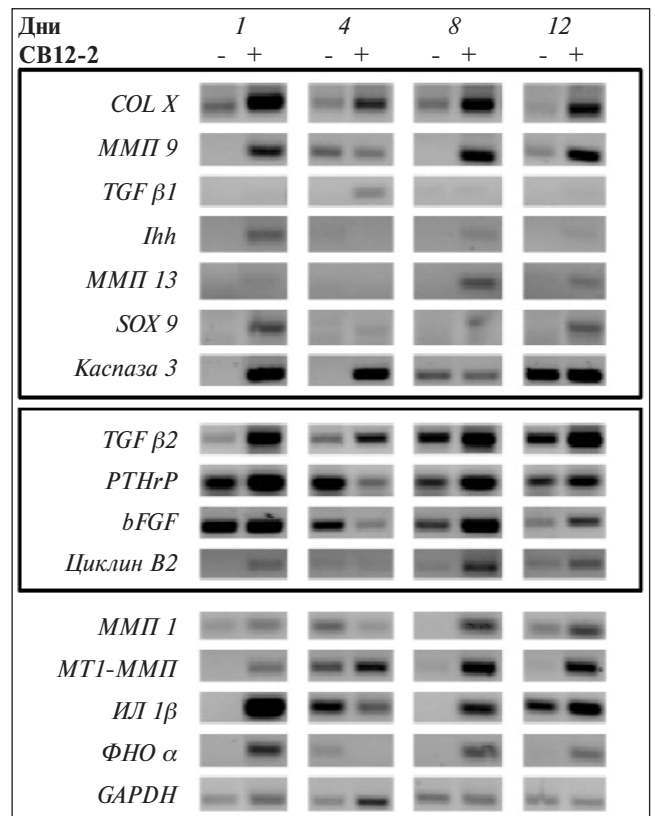


Рис. 2. Влияние пептида CB12-2 на экспрессию генов в эксплантатах хряща здорового мужчины 26 лет

щи человека, эксплантаты хряща коленного сустава культивировали в присутствии CB12-2, что сопровождалось повышением активности расщепления коллагена 2-го типа (рис. 1). При этом значительно более высокое накопление эпитопов, образующихся при расщеплении коллагена 2-го типа коллагеназой, происходило как в среде, так и в самой хрящевой ткани по сравнению с контрольными образцами, инкубируемыми в отсутствие пептида.

Влияние пептида CB12-2 на экспрессию генов в эксплантатах хряща человека. Повышение расщепления коллагена 2-го типа при культивировании эксплантатов хряща в присутствии CB12-2 сопровождалось увеличением экспрессии ММП 13, 9, 1, MT1-ММП, маркера гипертрофии — коллагена 10-го типа, маркера пролиферации циклина B2, цитокинов интерлейкина (ИЛ) 1 β , фактора некроза опухоли (ФНО) α , сопутствующих воспалительному процессу, каспазы 3, свидетельствующей о готовности клеток к апоптозу, и факторов роста: трансформирующего фактора роста (TGF) β 1 и β 2, пептида, родственного паратироидному гормону (PTHrP), фактора роста фибробластов (FGF) 2, индийского ежика (Ihh), активирующихся в хондроцитах пролиферативной и гипертрофной зон ростковой пластинки в процессе эндохондральной оссификации (рис. 2). Увеличение экспрессии наблюдалось начиная с 1-х суток инкубации в присутствии пептида и продолжалось в течение 12 дней. При этом повышение экспрессии ряда генов было конститутивным (COL10A1, MT1-ММП, TGF β 2). Напротив, экспрессия отдельных генов повышалась кратковременно (TGF β 1 — только на 4-е сутки). А в случае некоторых генов наблюдали несколько максимумов экспрессии: для Ihh — на 1-е и 8-е сутки, для цитокинов ИЛ 1, ФНО α , ММП 9, 13, 1, 9-го бокса,

определяющего половую область Y (SOX 9), пептида, родственного паратиреоидному гормону (PTHrP), фактора роста фибробластов (FGF) 2, циклина B2 — на 1, 8 и 12-й день. Экспрессия каспазы 3 значительно усиливалась на 1-й и 4-й дни, а при дальнейшем культивировании слабо отличалась от контрольных образцов.

Локализация коллагена 10-го типа. Повышение экспрессии гена *COL10A1* сопровождалось также повышенным синтезом соответствующего белка. В частности, на рис. 3 представлена локализация коллагена 10-го типа в эксплантате хряща человека на 8-й день его культивирования при добавлении пептида CB12-2. В отличие от контрольного образца, в присутствии CB12-2 происходило окрашивание зоны матрикса хряща вблизи его поверхности, причем более темная окраска, свидетельствующая о более высокой концентрации коллагена 10-го типа, наблюдалась вокруг хондроцитов.

Локализация апоптозной активности. Повышенная экспрессия каспазы 3 в эксплантатах суставного хряща в присутствии пептида CB12-2 сопровождалась усилением апоптозной активности в хондроцитах. При этом в первые дни культивирования никаких изменений не происходило (рис. 4). Однако на 12-й день апоптозные клетки появлялись вблизи поверхности эксплантата хряща, в зоне локализации коллагена 10-го типа.

Ингибирование активности расщепления коллагена, индуцированного пептидом CB12-2, смесью факторов роста. Ранее мы показали, что расщепление коллагена 2-го типа в эксплантатах хрящей больных ОА можно подавить смесью факторов роста (GF): TGF β 2, FGF 2 и инсулина, которые ранее использовались для ингибирования гипертрофии эмбриональных хондроцитов [7].

Поскольку под действием пептида CB12-2 происходило усиление расщепления коллагена, а также наблюдалось повышение экспрессии генов, ассоциированных с дифференцировкой хондроцитов, мы предположили, что эти изменения сходны с теми, что происходят в хряще при ОА. Поэтому повышенную активность расщепления коллагена можно подавить смесью факторов роста (GF), блокирующих разрушение коллагена и гипертрофный фенотип в хряще больных ОА.

Оказалось, что добавление смеси факторов роста (GF): TGF β 2, FGF 2 и инсулина — в среду, содержащую CB12-2, при культивировании эксплантатов хрящей человека действительно приводило к ингибированию активности расщепления коллагена до его уровня в контрольных

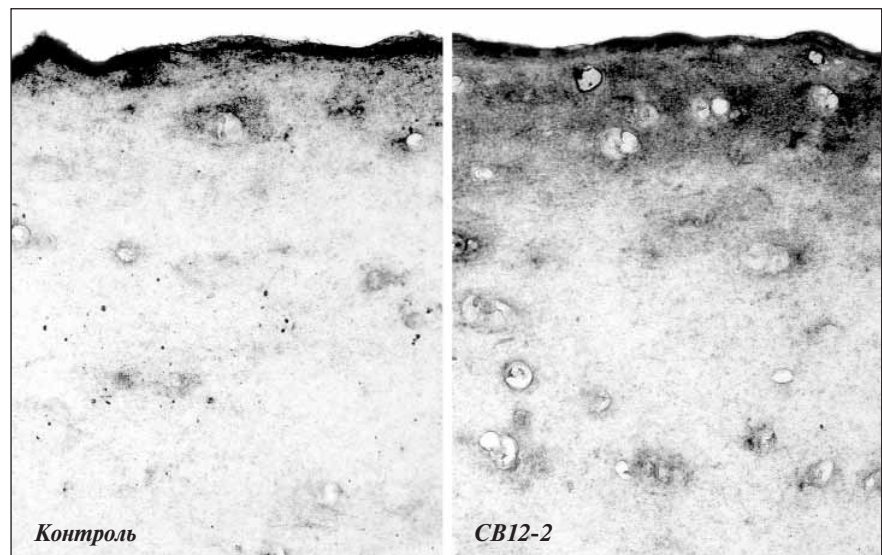


Рис. 3. Локализация коллагена 10-го типа в эксплантатах хряща человека, культивируемых в присутствии пептида CB12-2 в течение 8 дней

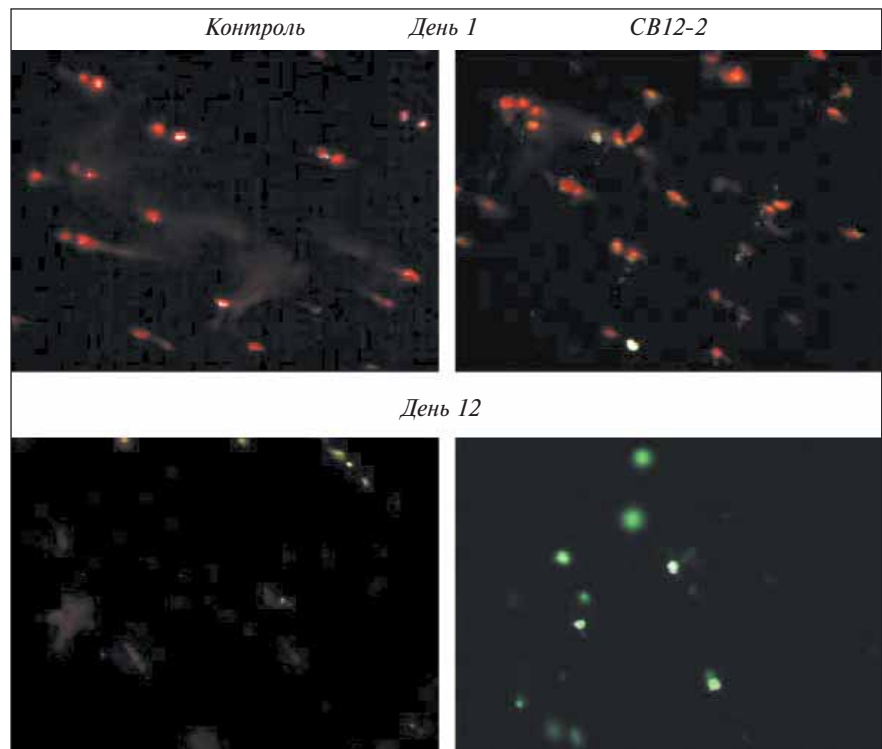


Рис. 4. Формирование апоптозных клеток в поверхностной зоне эксплантата хряща человека, культивируемых в присутствии пептида CB12-2

эксплантатах (рис. 5). При этом добавление смеси ростовых факторов к контрольным эксплантатам не приводило к значительному изменению коллагеназной активности.

Подавление смесью факторов роста экспрессии генов, индуцированных пептидом CB12-2. Анализ экспрессии генов в эксплантатах хряща человека, культивируемых с пептидом CB12-2 в присутствии или без GF, показал, что в 1-е сутки после добавления GF происходит подавление экспрессии всех исследованных протеиназ (ММП 13, 1, 9), цитокинов (ИЛ 1 β и ФНО α) и белков, сопряженных с гипертрофией хондроцитов (коллагена 10-го типа, каспазы 3,

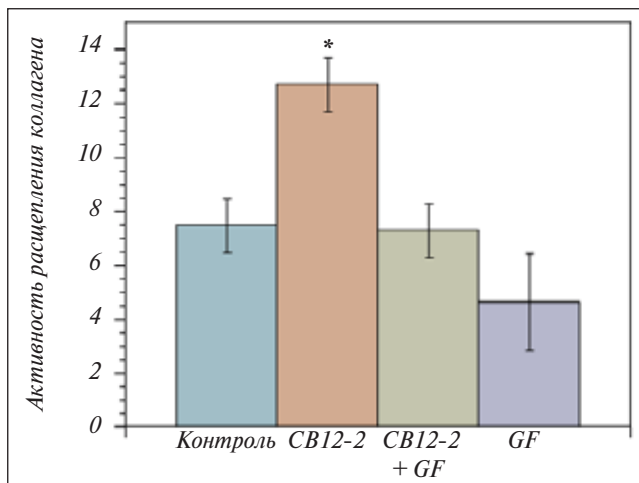


Рис. 5. Подавление коллагенолитического действия пептида CB12-2 смесью факторов роста (GF) в культуре эксплантатов хряща здорового мужчины 26 лет

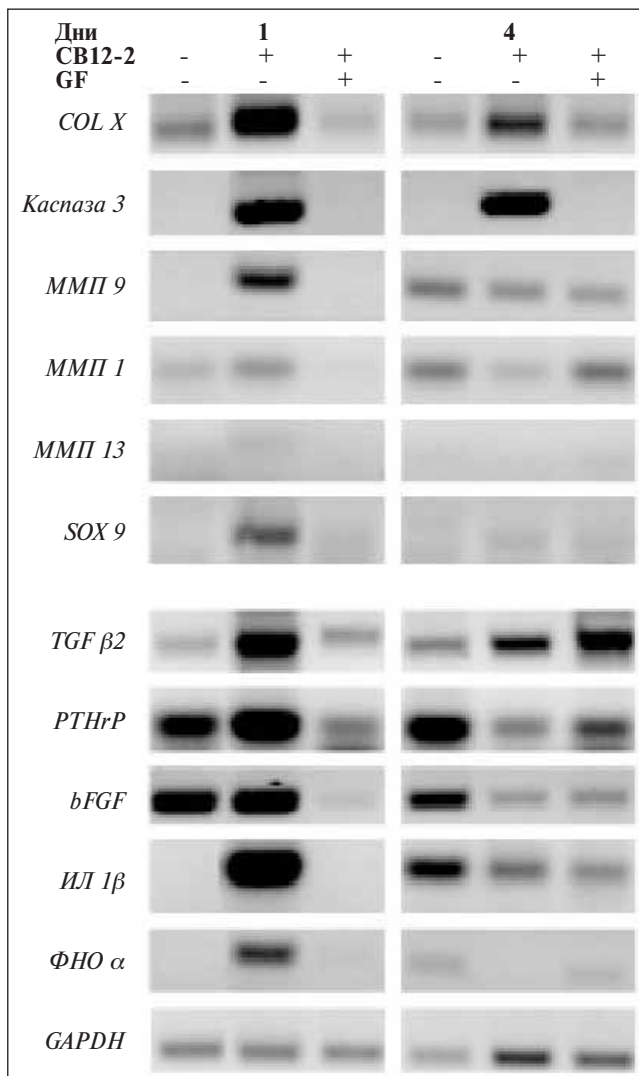


Рис. 6. Ингибирование экспрессии генов, индуцированных пептидом CB12-2, посредством факторов роста (GF)

SOX 9 и ростовых факторов TGF β2, FGF 2 и PTHrP), индуцированных пептидом CB12-2 (рис. 6). На 4-е сутки повышенная действием пептида CB12-2 экспрессия генов, ассоциированных с терминальной дифференцировкой хондроцитов, коллагена 10-го типа и каспазы 3, по-прежнему ингибировалась смесью факторов роста. Вместе с тем смесь факторов роста повышала экспрессию TGF β2 и PTHrP, которые, как показано выше, сами способны подавлять гипертрофию хондроцитов.

Обсуждение

Интенсивное расщепление коллагена коллагеназами хондроцитов происходит как на ранних этапах образования ОА-подобных повреждений [6, 12], так и при идиопатическом ОА [1, 13–15]. При этом коллагенолиз связан с повышением экспрессии генов, участвующих в терминальной дифференцировке (гипертрофии) хондроцитов [6, 7, 16]. Эти изменения сопровождаются значительным увеличением содержания денатурированного коллагена 2-го типа, состоящего из коротких пептидов [17]. Пептид, который мы исследовали в данной работе, экспонируется в больших количествах (10–25 мкМ) в хряще больных ОА [3, 17], т. е. в той концентрации, при которой мы наблюдали его активность *in vitro*.

Усиленная резорбция коллагена матрикса, связанная с гипертрофией хондроцитов и приводящая к расщеплению коллагена 2-го типа, происходит и в ростковой пластинке [18]. Это также сопровождается увеличением содержания денатурированного коллагена 2-го типа. При этом ингибирование коллагеназы ММП 13, ответственной за расщепление коллагена в суставном хряще [14] и ростковой пластинке, может предотвращать гипертрофию хондроцитов ростковой пластинки [19]. Поэтому мы предположили, что усиленное расщепление коллагена 2-го типа коллагеназой, которое индуцируется в нормальном суставном хряще CB12-2, может также быть связано с терминальной дифференцировкой (гипертрофией) хондроцитов. Недавно мы показали, что это действительно происходит в культуре эксплантатов бычьего суставного хряща. В данном исследовании мы наблюдали, что аналогичные изменения происходят также в культуре эксплантатов хряща человека: пептид CB12-2 индуцировал расщепление коллагена 2-го типа, которое сопровождалось экспрессией маркера гипертрофии – коллагена 10-го типа и апоптозом хондроцитов в поверхностной зоне хряща, там, где наблюдаются первичные изменения в хряще при ОА.

Наши результаты свидетельствуют о том, что триггером экспрессии гипертрофного фенотипа может быть усиленная денатурация коллагена 2-го типа и что хондроциты поддерживают свой предгипертрофный фенотип, когда они контактируют с матриксом, обогащенным нативным коллагеном 2-го типа. Но как только происходит усиленная денатурация этого коллагена, экспонируются криптические последовательности и клетки отвечают тем, что приступают к следующему этапу гипертрофной дифференцировки, завершающейся апоптозом.

Изменения, индуцируемые пептидом, происходят в поверхностной зоне хряща, как и в случае развития ОА. При ОА наблюдается увеличение объема хондроцита [20], что свойственно и гипертрофным хондроцитам ростковой пластинки, а также появление повышенного количества денатурированного коллагена 2-го типа [17], окрашивание на коллаген 10-го типа [4, 26], продукция аннексинов 2, 5, 6 и 8 [20, 21], кластерина, пролиферативного клеточного ядерного

антигена (PCNA), синдекана 3 и щелочной фосфатазы [21]. Продукции этих белков не наблюдается в здоровом хряще.

Поскольку общими чертами между разрушением коллагена 2-го типа при ОА и в гипертрофной зоне первичной ростковой пластинки являются повышение активности расщепления коллагена 2-го типа коллагеназами и экспрессия генов, связанных с гипертрофией хондроцитов [18, 23], неудивительно, что снижение активности расщепления коллагена 2-го типа индуцируется теми же факторами роста, которые подавляют гипертрофию хондроцитов ростковой пластинки в культуре клеток [8].

В нашем исследовании GF ингибировали экспрессию ИЛ 1 и ФНО α , которые, как и остальные исследованные гены, а именно *COL10A1*, ММП 13, 9, РТНРР, обычно не экспрессируются в нормальном суставном хряще [24]. При этом подавление экспрессии цитокинов ИЛ 1 β и ФНО α важно, поскольку они являются катаболическими факторами при ОА, а ингибирование этих цитокинов приводит к подавлению коллагеназной активности в хряще при ОА [25].

Заключение

Таким образом, наши исследования показали, что пептид коллагена 2-го типа способен вызывать повышенное расщепление коллагена в эксплантатах хряща человека, которое сопровождается экспрессией белков, в норме участвующих в дифференцировке эмбриональных хондроцитов. Коллагенолитическую активность, экспрессию провоспалительных цитокинов ИЛ 1 β и ФНО α и гипертрофного фенотипа суставных хондроцитов, индуцированные пептидом, можно подавить факторами роста, способными ингибировать гипертрофию хондроцитов ростковой пластинки. Поэтому взаимодействие пептида с эксплантатами хряща человека может являться модельной системой развития остеоартрозных изменений в хряще человека. Поскольку факторы роста могут играть роль, которая благоприятствует предгипертрофному фенотипу, лекарственные препараты, способные регулировать дифференцировку хондроцитов, могут быть эффективны при лечении разрушения хряща у больных ОА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Billingham R.C., Dahlberg L., Ionescu M. et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1997;99:1534–45.
2. Hollander A.P., Pidoux I., Reiner A. et al. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* 1995;96:2859–69.
3. Yasuda T., Tchetina 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.
4. Von der Mark K., Kirsh T., Nerlich A. et al. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. *Arthr Rheum* 1992;35:806–11.
5. Poole A.R. Cartilage in health and disease. In: Koopman W.J., Moreland L.W. (eds). *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*, 15th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams&Wilkins, 2005;223–69.
6. 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.
7. Tchetina E.V., Antoniou J., Tanzer M. et al. Growth factors capable of suppressing chondrocyte hypertrophy arrest collagen cleavage in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 2006;168:131–40.
8. Szuts V., Mollers U., Bittner K. et al. Terminal differentiation of chondrocytes is arrested at distinct stages identified by their expression repertoire of marker genes. *Matrix Biol* 1998;17:435–48.
9. Morales T.L., Wahl L.M., Hascall V.C. The effect of bacterial lipopolysaccharides on the biosynthesis and release of proteoglycans from calf articular cartilage cultures. *J Biol Chem* 1984;259:6720–9.
10. Van der Kraan P.M., Vitters E.L., Meijers T.H. et al. Collagen type I antisense and collagen type IIA messenger RNA is expressed in adult murine articular cartilage. *Osteoarthr Cartilage* 1998;6:417–26.
11. Gallyas F., Merchenthaler I. Copper-H2O2 oxidation strikingly improves silver intensification of the nickel-diaminobenzidine (Ni-DAB) end-product of the peroxidase reaction. *J Histochem Cytochem* 1988;36:807–10.
12. Aurich M., Squires G.R., Reiner A. et al. Differential matrix degradation and turnover in early cartilage lesions of human knee and ankle joints. *Arthr Rheum* 2005;52:112–9.
13. Wu W., Billingham R.C., Pidoux I. et al. Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthr Rheum* 2002;46:2087–94.
14. 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). *Arthr Rheum* 2000;43:673–82.
15. Squires G.R., Pidoux I., Okouneff S. et al. The development of focal lesions in aging human articular cartilage involves molecular changes in type II collagen and aggrecan characteristic of osteoarthritis. *Arthr Rheum* 2002;48:1261–70.
16. Sandel L.J., Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: Cell biology of osteoarthritis. *Arthr Res* 2001;3:107–13.
17. Hollander A.P., Heathfield T.F., Webber C. et al. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin Invest* 1994;93:1722–32.
18. Mwale F., Tchetina E., Wu C.W. et al. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res* 2002;17:275–83.
19. Wu W., Tchetina E., Mwale F. et al. Proteolysis involving MMP-13 (collagenase-3) and the expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype. *J Bone Miner Res* 2002;17:639–51.
20. Bush P.G., Hall A.C. The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. *Osteoarthr Cartilage* 2003;11:242–51.
21. Pfander D., Swoboda B., Kirsch T. Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *Am J Pathol* 2001;159:1777–83.
22. Kirsch T., Swoboda B., Nah H. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartilage* 2000;8:294–302.
23. Tchetina E., Mwale F., Poole A.R. Distinct phases of coordinated early and late gene expression in growth plate chondrocytes in relationship to cell proliferation, matrix assembly, remodeling, and cell differentiation. *J Bone Miner Res* 2003;18:844–51.
24. Aigner T., McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:5–18.
25. Kobayashi M., Squires G.R., Mousa A. et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthr Rheum* 2005;52:128–35.
26. Boos N., Nerlich A.G., Wiest I. et al. Immunohistochemical analysis of type-X-collagen expression in osteoarthritis of the hip joint. *J Orthop Res* 1999;17:495–502.

Поступила 13.03.2010