

Е.В. Четина

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

ПЕПТИД КОЛЛАГЕНА 2-ГО ТИПА СПОСОБЕН УСКОРЯТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ХОНДРОЦИТОВ: ВЗАИМОСВЯЗЬ С РЕЗОРБЦИЕЙ МАТРИКСА СУСТАВНОГО ХРЯЩА ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ

Контакты: Елена Васильевна Четина etchetina@mail.ru

Цель. Исследовать влияние пептида коллагена 2-го типа (CP) на расщепление коллагена 2-го типа и дифференцировку эмбриональных хондроцитов разных морфотипов, выделенных из ростковой пластинки быка.

Материал и методы. Бычьи хондроциты ростковой пластинки разделяли в градиенте перкола на морфотипы в соответствии с разными стадиями дифференцировки и далее культивировали в присутствии или без 10 мкМ CP. Эксплантаты хрящей больных остеоартрозом (OA) также культивировали в присутствии 10 мкМ CP. Активность расщепления коллагена 2-го типа оценивали посредством ELISA. Экспрессию генов анализировали посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Результаты. Клетки, обладающие наибольшей плавучей плотностью в градиенте перкола (субпопуляция E), представлены хондроцитами ранней пролиферативной зоны ростковой пластинки. В присутствии CP в них повышалась экспрессия генов трансформирующего фактора роста (TGF) β 2, пептида, родственного паратириодному гормону (PTHrP), ростового фактора фибробластов (FGF) 2 и циклина B2, которые экспрессируются в пролиферативной зоне ростковой пластинки, а также металлопротеиназы матрикса (MMP) 13 и активность расщепления коллагена. Крупные клетки с наиболее низкой плавучей плотностью в градиенте перкола (субпопуляция B) представлены гипертрофными хондроцитами. Культивирование этих клеток в присутствии CP увеличивало экспрессию генов, ассоциированных с терминальной дифференцировкой хондроцитов: коллагена 10-го типа (COL10A1), индийского ежика (Ihh), сердцевинного связывающего фактора (CBFA) 1 и TGF β 1, а экспрессия MMP 13 подавлялась. При этом активность расщепления коллагена в культуре хондроцитов субпопуляции B в присутствии CP не изменялась. Хотя пептид коллагена 2-го типа способен индуцировать расщепление коллагена в эксплантатах здорового суставного хряща, которое сопровождалось повышением экспрессии генов, ассоциированных с гипертрофной зоной эмбриональной ростковой пластинки, он не влиял на скорость расщепления коллагена в хряще больных OA.

Выводы. Влияние CP на экспрессию генов и активность расщепления коллагена зависит от морфотипа эмбриональных хондроцитов. Отсутствие влияния CP на активность расщепления коллагена как в эмбриональных гипертрофных хондроцитах, так и в эксплантатах хряща больных OA подтверждает гипотезу о том, что гипертрофный морфотип является доминирующим морфотипом суставных хондроцитов при OA. Более того, продукты разрушения коллагена могут участвовать в резорбции матрикса при OA и в поддержании хронического характера патологии.

Ключевые слова: ростковая пластинка, экспрессия генов, дифференцировка хондроцитов, пептид коллагена 2-го типа, коллагеназа

TYPE II COLLAGEN PEPTIDE IS ABLE TO ACCELERATE EMBRYONIC CHONDROCYTE DIFFERENTIATION: AN ASSOCIATION WITH ARTICULAR CARTILAGE MATRIX RESORPTION IN OSTEOARTHRISIS

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 (CP) on the decomposition of type II collagen and the differentiation of embryonic chondrocytes of various morphotypes, isolated from the bovine growth plate.

Material and methods. Bovine growth plate chondrocytes were separated into morphotypes on a Percoll gradient in accordance with different differentiation stages and then cultured in the presence or absence of 10 μ M of CP. Cartilage explants from patients with osteoarthritis (OA) were also cultured in the presence of 10 μ M of CP. Type II collagen decomposition activity was evaluated by ELISA. Gene expressions were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results. The cells having the highest buoyant density on a Percoll gradient (subpopulation A) were represented as early proliferative zone chondrocytes in the growth plate. In their presence of CP, there was increased expression of the genes of transforming growth factor (TGF) β 2, parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), fibroblast growth factor (FGF) 2, and cyclin B2, which were expressed in the proliferative zone of the growth plate, as well as metalloproteinase matrix (MMP) 13 and collagen decomposition activity. The large cells with the lowest buoyant density on a Percoll gradient (subpopulation B) were represented as hypertrophic chondrocytes. Cultivation of these cells in the presence of CP increased the expression of the genes associated with the terminal chondrocyte differentiation of type X collagen (COL10A1), Indian hedgehog (Ihh), core-binding factor (CBFA) 1 and TGF β 1; and the expression of MMP 13 was suppressed. At the same time, collagen decomposition activity in cultured chondrocytes remained unchanged in the presence of CP. Although type II collagen was able to induce the collagen decomposition in the healthy articular cartilage explants, which was attended by the increased expression of the genes associated with the hypertrophic zone of an embryonic growth plate, it did not affect collagen decomposition rate in the cartilage of patients with OA.

Conclusion. The effect of CP on gene expression and collagen decomposition activity depends on the morphotype of embryonic chondrocytes. Lack of effect of CP on collagen decomposition activity in both the embryonic hypertrophic chondrocytes and the cartilage

explants from OA patients supports the hypothesis that the hypertrophic morphotype is a dominant morphotype of articular chondrocytes in OA. Moreover, collagen decomposition products can be involved in the resorption of matrix in OA and in the maintenance of chronic nature of the pathology.

Key words: *growth plate, gene expression, chondrocyte differentiation, type II collagen peptide, collagenase*

Деградация суставного хряща при остеоартрозе (ОА) включает усиленную резорбцию внеклеточного матрикса (ВКМ) вследствие его расщепления посредством коллагеназы 3 (MMP 13), денатурации и потери коллагена 2-го типа, а также дифференцировку хондроцитов [1]. При дифференцировке хондроцитов происходят их пролиферация, созревание и превращение в гипертрофные клетки/терминально-дифференцированные хондроциты. Недавно наши исследования *in situ* показали, что в бычьей ростковой пластинке в пролиферативной зоне наблюдались пики экспрессии ростовых факторов пептида, родственного паратироидному гормону (PTHrP), и ростового фактора фибробластов (FGF) 2. Напротив, такие гены, как коллаген 10-го типа (COL10A1), сердцевинный связывающий фактор (Cbfa) 1, трансформирующий фактор роста (TGF) β 1, индийский эжик (Ihh) и металлопротеиназа матрикса (MMP) 9, экспрессировались только в гипертрофной зоне. Гены, ответственные за синтез и деградацию ВКМ, — коллаген 2-го типа и MMP 13 соответственно — имели два максимума экспрессии в верхнепролиферативной и гипертрофной зонах ростковой пластинки [2].

Ранее проведенные исследования показали, что хондроциты ростковой пластинки эмбриона быка можно фракционировать в градиенте перкола [3–7]. В градиенте клетки формировали 5 отдельных полос, которые представляли субпопуляции А, В, С, D и E, которые находились на разных стадиях дифференцировки. При этом субпопуляция А представляла позднегипертрофные хондроциты, а субпопуляция E — верхнепролиферативные хондроциты. Субпопуляции В–E обладали достаточной жизнеспособностью и при культивировании *in vitro* формировали ВКМ, а затем созревали, экспрессировали гипертрофный фенотип и кальцифицировали ВКМ. При этом терминальной дифференцировки раньше всего достигали прегипертрофные хондроциты субпопуляции В, а раннепролиферативным клеткам субпопуляции E требовалось значительно более длительное время [3].

Расщепление компонентов ВКМ приводит к генерации продуктов деградации, которые участвуют в круговороте матрикса. Например, фрагменты фибронектина способны индуцировать хондролитиз и деградацию агрекана *in vitro* [8, 9]. Мы показали недавно, что фрагменты коллагена 2-го типа также способствуют резорбции матрикса. Так, синтетический пептид коллагена 2-го типа CB12-2 (CP) может индуцировать расщепление коллагена 2-го типа в здоровом хряще быка [10–12]. Поскольку это сопровождалось увеличением экспрессии генов поздней дифференцировки хондроцитов, мы предположили, что резорбция коллагеновой сети при раннем ОА контролируется механизмами разрушения ВКМ, которые регулируют терминальную дифференцировку хондроцитов ростковой пластинки [2].

Если данное предположение верно, то пептид CP должен по-разному влиять на хондроциты ростковой пластинки, находящиеся на разных стадиях дифференцировки. Кроме того, особенности ответа хондроцитов разного уровня дифференцировки на CP могут прояснить взаимосвязь между процессами, происходящими в гипертрофной зоне ростковой пластинки и в суставном хряще при ОА.

В связи с этим в данной работе мы исследовали влияние CP на активность расщепления коллагена и экспрессию генов, ответственных за дифференцировку эмбриональных хондроцитов, в культурах клеток прегипертрофных (субпопуляция В) и раннепролиферативных (субпопуляция E) хондроцитов ростковой пластинки быка и хондроцитов суставного хряща здоровых людей и больных ОА.

Материал и методы

Фракционирование эмбриональных хондроцитов. Бычьи эмбриональные хондроциты выделяли и фракционировали, используя градиент плотности перкола [5]. При этом ростковые пластинки эмбрионов быка в возрасте 200 дней разрезали на кубики со стороной 2–4 мм, переваривали в среде, содержащей DMEM, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 0,18% коллагеназы типа 1A, 0,1% гиалуронидазы и 0,01% ДНКазы 1 в течение ночи при 37 °C при слабом покачивании. После этого непереваренный хрящ удаляли. Изолированные клетки дважды отмывали DMEM, содержащей антибиотика, при комнатной температуре, далее один раз цитратным буфером (125 мМ NaCl, 18 мМ лимонной кислоты и 10 мМ K_2HPO_4 , pH 6,0), чтобы растворить остатки минерала кальцинированного хряща. Далее клетки фракционировали в градиенте перкола.

Для этого стерильно готовили 7 растворов перкола (плотностью от 1,01 до 1,07 г/мл), которые использовали для приготовления градиента. 1 мл клеточной суспензии, содержащей $25–30 \cdot 10^6$ клеток/мл в DMEM и 0,01% ДНКазы 1 наслаивали на вершину градиента. Пробирки центрифугировали при 400 g 30 мин при комнатной температуре. Это приводило к формированию 5 клеточных фракций (рис. 1), соответствующих субпопуляциям А (верхняя фракция клеточных фрагментов), В (субпопуляция прегипертрофных хондроцитов), С, D, E (нижняя фракция — субпопуляция верхнепролиферативных хондроцитов).

Культивирование эмбриональных хондроцитов

Хондроциты субпопуляций В и E, которые представляют верхнепролиферативные и гипертрофные хондроциты соответственно [3–5], засеивали (2 мл в лунку) на 48-луночные плоскодонные планшеты (Falcon, США) при плотности $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Клетки культивировали в 2 мл DMEM в присутствии 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 6,5% CO_2 при 37 °C в течение 2 дней. Далее среду заменяли на DMEM с 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 5 мМ β -глицерофосфата натрия (оба раствора были свежеприготовленными при каждой смене среды), 5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферрина, 5 нг/мл селенита натрия (ITS, Boehringer Mannheim), 1 мг/мл гидролизованного бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma) и культивировали 24 ч. После этого добавляли 10 мкМ коллагенового пептида (CP) и культивировали в течение 16 сут. Среду меняли каждые 2 дня.

Подготовка суставного хряща. Суставной хрящ дистальной части бедренной кости здоровых людей получали после аутопсии, а от больных ОА — после полного удаления коленного сустава при артропластике. В исследовании использовали хрящи 14 больных ОА (средний возраст

67±6,8 года) и хрящи 3 здоровых индивидов мужского пола (26, 48 и 57 лет).

Хрящи готовили по общепринятой методике [13]. Хрящи трижды отмывали Дюльбекко модифицированной средой Игла-А (DMEM-A, Life Technologies), содержащей также 20 ммоль/л буфера HEPES, pH 7,4, 45 ммоль/л NaHCO₃, 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 °С в 1 мл DMEM-A в атмосфере 95% воздуха и 5% CO₂.

Культивирование хрящевых эксплантатов. Среду меняли через 48 ч (следующий после этого день считали началом опыта — день 0), а затем — через каждые 4 дня. В работе использовали синтетический пептид CB12-2 (CP) описанный нами ранее [11] и представляющий собой фрагмент коллагена 2-го типа (аминокислотные остатки 195—218) GERGPP*GPQGARGFF*GTP*GLP*GVK (где * означает окси-пролин). CP 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 °С 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 CP 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 [14].

Определение активности расщепления коллагена 2-го типа коллагеназой с использованием фермент-зависимого иммуносорбентного метода (ELISA). После 16 сут культивирования эксплантаты хрящей экстрагировали α-химотрипсином, чтобы перевести в раствор, не переваривая, денатурированный коллаген, включая карбокси-терминальный нео-эпитоп COL2-3/4C (C1,2C), образуемый при расщеплении коллагена 2-го типа коллагеназой. Его содержание в культуральной среде и α-химотрипсиновом экстракте хряща определяли посредством ELISA [15]. Суммарный нео-

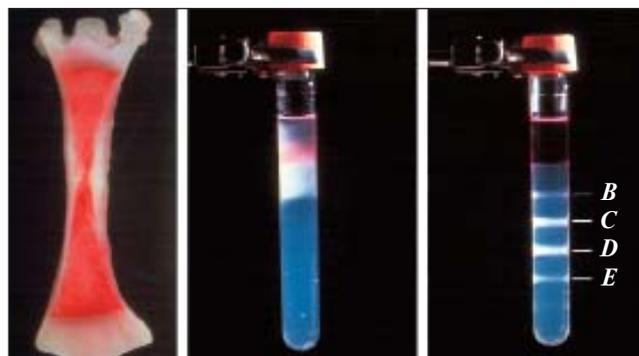


Рис. 1. Фракционирование эмбриональных хондроцитов ростковой пластинки быка в градиенте плотности перкола. Локализация субпопуляций B, C, D, E

эпитоп расщепления в хряще и в 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.

Выделение общей РНК, обратная транскрипция (ОТ). РНК выделяли из клеток субпопуляций эмбриональных хондроцитов после их культивирования в течение 24 и 48 ч по общепринятой методике [16]. В реакции ОТ использовали суммарную РНК хряща и проводили ее также по общепринятой методике [16].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованные в работе, представлены в таблице. ПЦР проводили как описано ранее [16]. GAPDH (глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа) служила в качестве эндогенного контроля. Применяя 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 ± стандартная вариация. Анализ проводили в 3 повторностях. Тест на нормальность показал, что результаты соответствовали кривой распределения Гаусса. Для статистической обработки результатов использовали тесты Манна—

Последовательности праймеров, использованные в работе

Коллагеназа 3 (MMP 13): D (1241—1259)GATAAAGACTATCCGAGAC, R(1369—1386) GAGTAACCGTATTGTTCG
Желатиназа В (MMP 9): D (139—156) GCAGAGGAATACCTGTAC, R (361—377) CACAACATCACCTACTG
Коллаген 10-го типа (COL10A1): D (213—232) CTGAGCGATACCAAACACC, R (297—319) GTAAAGGTGTATCACTGAGAGG
Циклин В2: D (932—949) GTTGACTATGACATGGTG; R (1272—1290) GTTCGTGCACTTTGTCTTG
Трансформирующий фактор роста β1 (TGF β1): TGFβ1-D (126—143) GGCAACAAAATCTATGAC, TGFβ1-R (471—490) STTCAAGTGGACATTAACGG
Трансформирующий фактор роста β2 (TGF β2): TGFβ2-D (943—962) GATTTGACGTCTCAGCAATG, TGFβ2 (1324—1343) CATATACCAGTGGTGATCAG
Индийский ежик (Ihh): Ihh-R (476—494) CAGGTCATCGAGACTCAGG, Ihh-R (773—789) GCTCAGTTGGCCTTCTG
Основной фактор роста фибробластов (bFGF, FGF-2): bFGF-D (975—994) GGCACACATTAATCTACATG, bFGF-R (1262—1282) CCACTCACACTTTAAGCATTC
Пептид, родственник паратиреоидному гормону (PTHrP): PTHrP-D (233—253) GAAATCAGAGCTACCTCGGAG; PTHrP-R (317—336) GATGAGGGCAGATACCTAAC;
Сог-связывающий фактор (CBFA1): CBFA1-D (365—385) GGTTCAACGATCTGAGATTTG; CBFA1-R (573—594) GCGCATTCCTATCCCAGTATG
Глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH): G3PDH-D (605—628) GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC, G3PDH-R (927—950) AGCTCATTTCTGGTATGAC

Уитни и парный тест Стьюдента (t-тест). Значения вероятности ошибки <0,05 считались достоверными.

Результаты

Индукция расщепления коллагена 2-го типа под действием CP в здоровом суставном хряще и хряще больных ОА. Ранее мы показали, что пептид коллагена 2-го типа CP способен индуцировать расщепление коллагена коллагеназой в эксплантатах хряща взрослых быков [10–12]. Это сопровождалось повышением активности расщепления коллагена 2-го типа, увеличением экспрессии MMP, провоспалительных цитокинов и маркеров дифференцировки хондроцитов, активирующихся в клетках пролиферативной и гипертрофной зон ростковой пластинки в процессе эндохондральной оссификации

Чтобы проверить, оказывает ли данный пептид аналогичное действие на хрящи здоровых и больных ОА людей, эксплантаты этих хрящей также культивировали в присутствии CP. Оказалось, что CP значительно повышает активность расщепления коллагена в эксплантатах здоровых людей, однако не способен влиять на скорость расщепления коллагена эксплантатами хряща больных ОА (рис. 2).

Индукция расщепления коллагена 2-го типа под действием CP хондроцитами эмбриональной ростковой пластинки быка. Мы предположили, что хондроциты в хряще больных ОА нечувствительны к CP, поскольку они уже активированы и терминально дифференцированы как гипертрофные хондроциты ростковой пластинки. Для проверки этой гипотезы мы исследовали влияние коллагенового пептида CP на активность расщепления коллагена в верхнепролиферативных и прегипертрофных хондроцитах эмбриональной ростковой пластинки быка, фракционированных в градиенте перкола.

Оказалось, что CP может индуцировать расщепление коллагена 2-го типа при культивировании в течение 15 дней эмбриональных хондроцитов с наибольшей плавучей плотностью (субпопуляция E), представляющих собой хондроциты верхнепролиферативной зоны ростковой пластинки (рис. 3). При этом только на 4-е и 15-е сутки существенных различий в расщеплении коллагена в присутствии и в отсутствие CP не наблюдалось.

Напротив, в крупных хондроцитах с низкой плавучей плотностью, представляющих собой клетки верхнегипертрофной зоны ростковой пластинки (субпопуляция B), CP не влиял на скорость расщепления коллагена, за исключением 4-х суток, когда CP даже существенно понижал активность резорбции коллагена по сравнению с контрольной культурой (см. рис. 3).

Влияние CP на экспрессию генов в культурах субпопуляций хондроцитов. Пролиферативные хондроциты субпопуляции E, культивируемые 6 ч без CP, экспрессировали только ростовые факторы пролиферативной зоны ростковой пластинки — PTHrP и FGF 2 (рис. 4). Через 24 ч в культуре клеток субпопуляции E обнаруживалась экспрессия MMP 13 и 9, а также циклина B2, TGF β2, PTHrP и FGF 2. Вместе с тем экспрессия генов, связанных с терминальной дифференцировкой хондроцитов, не отмечалась в течение всего времени наблюдения.

Индукция активности расщепления коллагена пептидом CP в пролиферативных хондроцитах субпопуляции E сопровождалась повышением экспрессии MMP 13 и генов, связанных с пролиферацией хондроцитов: циклина B2 и ростовых факторов TGF β2, PTHrP и FGF 2 — уже через 6 ч после внесения пептида и сохранялась через 24 ч.

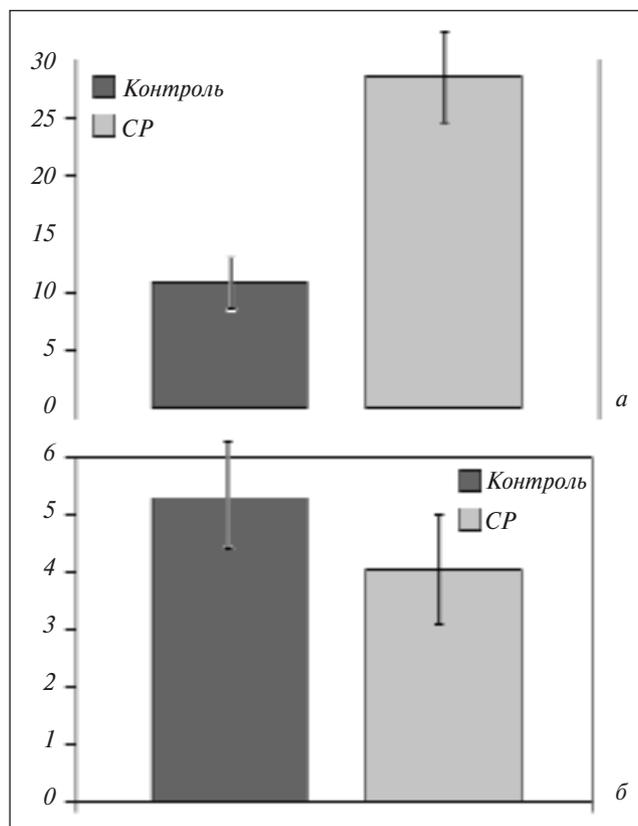


Рис. 2. Влияние пептида CP на активность расщепления коллагена 2-го типа в эксплантатах хряща здоровых людей (а) и больных ОА (б)

Экспрессия генов, ассоциированных с терминальной дифференцировкой хондроцитов: COL10A1, TGF β1 и MMP 9 — также незначительно повышалась через 6 ч инкубации, однако через 24 ч более не наблюдалась.

После 6 ч культивирования прегипертрофных хондроцитов субпопуляции B в контрольной культуре без CP наблюдалась экспрессия MMP 13 и 9, а также генов, ассоциированных с пролиферативной зоной ростковой пластинки: циклина B2 и ростовых факторов TGF β2, PTHrP и FGF 2. Однако через 24 ч эти хондроциты мощно экспрессировали гены гипертрофных хондроцитов ростковой пластинки — COL10A1, Ihh, Cbfa1 и TGF β1. Напротив, экспрессия генов пролиферативной зоны заметно снижалась, за исключением TGF β2.

В хондроцитах субпопуляции B CP подавлял экспрессию MMP (13 и 9), циклина 2 и ростовых факторов, ассоциированных с пролиферацией: TGF β2 и FGF 2 — как через 6 ч, так и через сутки культивирования. Напротив, экспрессия генов терминальной дифференцировки хондроцитов, а именно COL10A1, Ihh, Cbfa1 и TGF β1, повышалась через 6 ч культивирования. Однако через 24 ч экспрессия COL10A1 и Ihh практически не отличалась от контрольных клеток, а экспрессия Cbfa1 и TGF β1 была ниже в присутствии CP, как и в случае вышеназванных генов, ассоциированных с пролиферацией хондроцитов.

Обсуждение

Главной функцией суставного хряща является формирование поверхности, способной выдерживать большие нагрузки при малом трении для беспрепятственного движения сустава. Ранее мы предположили [16], что сохранение такой поверхности обеспечивается прекращением созревания сус-

тавных хондроцитов перед их терминальной дифференцировкой, о чем свидетельствует отсутствие экспрессии коллагена 10-го типа и щелочной фосфатазы. Этим они отличаются от эмбриональных хондроцитов, в которых эндохондральная оссификация включает запрограммированный процесс, завершающийся терминальной дифференцировкой и минерализацией. Кроме того, суставные хондроциты здорового хряща нечувствительны к факторам, которые влияют на созревание эмбриональных хондроцитов. Действие факторов, которые сдерживают созревание суставных хондроцитов, ослабевает только в случае ОА. При этом наблюдаются пролиферация и увеличение экспрессии маркеров гипертрофии, что свидетельствует об их терминальной дифференцировке.

Дифференцировка эмбриональных хондроцитов ростковой пластинки может регулироваться различными агентами и физическими факторами, которые способны изменять ее скорость. Например, ростовые факторы TGF β 2, FGF 2, PTH/PTHrP способны задерживать дифференцировку хондроцитов, тогда как ретиноиды, повышение внутриклеточного уровня Ca²⁺, механический стресс и тиреоидные гормоны ускоряют процесс эндохондральной оссификации [4, 17–23]. Более того, разные части одной и той же молекулы могут оказывать двойное действие: например, аминокотерминальные последовательности PTH подавляют экспрессию маркера гипертрофии — коллагена 10-го типа, тогда как срединный фрагмент PTH способен стимулировать его продукцию [6].

Ранее мы предположили, что коллагеновый пептид CP также может служить одним из регуляторов фенотипических превращений хондроцитов в эмбриональной ростковой пластинке, поскольку он оказался способен индуцировать экспрессию маркеров гипертрофии хондроцитов в эксплантатах здорового суставного хряща [10–12]. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что CP действительно является бифункциональным регулятором дифференцировки хондроцитов, поскольку в прегипертрофных хондроцитах субпопуляции В он ингибирует экспрессию MMP 13, а в клетках, находящихся на пролиферативной стадии дифференцировки (субпопуляции Е), повышает ее. Это указывает на участие MMP 13 в ремоделировании матрикса при пролиферации, а фрагментов коллагена, включая CP, — в активации этого процесса. С другой стороны, ингибирование экспрессии MMP 13 в прегипертрофных хондроцитах может указывать на то, что активация металлопротеиназ предшествует синтезу коллагена 10-го типа с целью освобождения внекле-

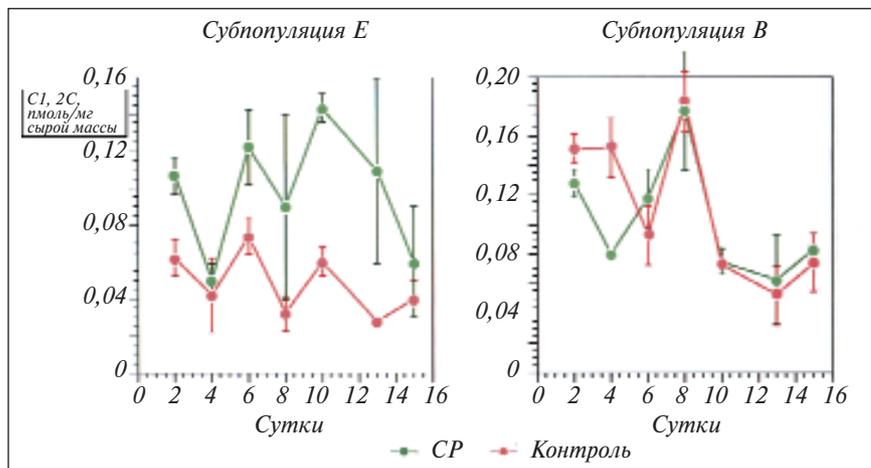


Рис. 3. Влияние пептида CP на активность расщепления коллагена 2-го типа в культурах разных субпопуляций эмбриональных хондроцитов ростковой пластинки быка

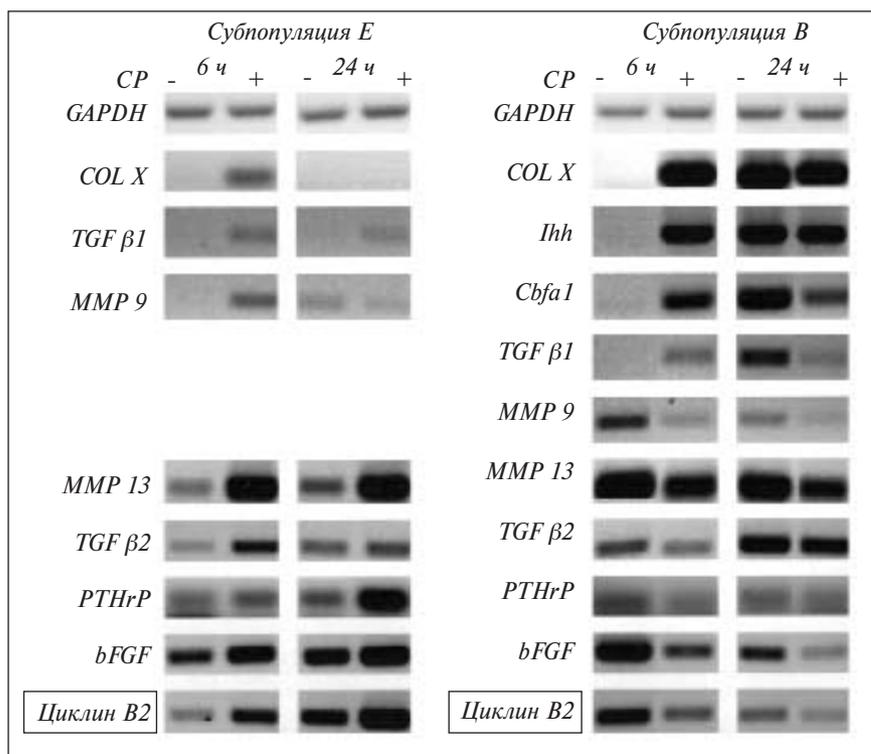


Рис. 4. Влияние CP на экспрессию генов в культурах разных субпопуляций эмбриональных хондроцитов ростковой пластинки быка

точного пространства, а когда матрикс, обогащенный коллагеном 10-го типа, сформировался, протеазная активность уменьшается для поддержания его концентрации. Это согласуется с данными наших исследований бычьей ростковой пластинки *in situ*, которые показали, что повышение экспрессии MMP 13 наблюдалось на один срез выше, чем появление коллагена 10-го типа [2].

Повышение экспрессии MMP 13 под влиянием CP в раннепролиферативных хондроцитах субпопуляции Е сопровождалось постепенным увеличением уровня экспрессии PTHrP и FGF 2 и кратковременным (только через 6 ч) — TGF β 2. Это может указывать на то, что TGF β 2 служит переключателем клеточных процессов, в то время как PTHrP и FGF 2 ответственны за ход пролиферации. Это также согласуется с

результатами наших исследований *in situ*, которые показали, что PTHrP и FGF 2 экспрессируются на всем протяжении пролиферативной зоны, тогда как TGF β 2 имеет 4 острых пика экспрессии в разных зонах ростковой пластинки [2].

Кратковременная экспрессия генов, ассоциированных с гипертрофными изменениями, а именно COL10A1, TGF β 1 и MMP 9, в раннепролиферативных хондроцитах субпопуляции E в присутствии CP и, напротив, устойчивая экспрессия их в ассоциации с Cbfa1 и Ihh свидетельствуют о том, что способность экспрессировать эти факторы является предпосылкой действительного перехода хондроцитов к гипертрофии. Это согласуется с данными других авторов, показавших, что экспрессия Cbfa1 является необходимым условием терминальной дифференцировки хондроцитов [24, 25]. Следует также отметить, что экспрессию COL10A1 и Ihh наблюдали и в культуре аналогичной фракции гипертрофных хондроцитов бычьей ростковой пластинки в исследованиях других авторов [6].

Отсутствие эффекта пептида CP на активность расщепления коллагена 2-го типа в эксплантатах хряща боль-

ных OA также подтверждает нашу гипотезу о том, что суставные хондроциты при OA имеют морфотип терминально дифференцированных (гипертрофированных) эмбриональных хондроцитов. Поэтому при OA происходит функциональная потеря механизмов, сдерживающих дифференцировку хондроцитов суставного хряща.

Выводы

Наши результаты свидетельствуют о том, что влияние CP на расщепление коллагена и экспрессию генов зависит от статуса дифференцировки хондроцитов. Они подтверждают нашу гипотезу о том, что в хряще больных OA гипертрофия хондроцитов является доминирующим фенотипическим превращением. При этом CP может индуцировать деградацию суставного хряща как на начальных стадиях при OA, так и при поддержании хронического характера патологии, а также участвовать в дифференцировке хондроцитов при развитии скелета. В связи с этим контроль фенотипа суставных хондроцитов посредством лекарственных препаратов может быть новым терапевтическим подходом для лечения больных OA.

ЛИТЕРАТУРА

- Poole A.R. Cartilage in health and disease. In: Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, ed 15. Ed. by Koopman W. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2005;223—69.
- Tchetina E.V., 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, remodelling and cell differentiation. *J Bone Miner* 2003;18:844—51.
- Alini M., Carey D., Hirata S. et al. Cellular and matrix changes before and at the time of calcification in the growth plate studied in vitro: arrest of type X collagen synthesis and net loss of collagen when calcification is initiated. *J Bone Miner Res* 1994;9:1077—87.
- Alini M., Kofsky Y., Wu W. et al. In serum-free culture thyroid hormones can induce full expression of chondrocyte hypertrophy leading to matrix calcification. *J Bone Miner Res* 1996;11:105—13.
- Carey D.E., Alini M., Matsui Y. et al. Density gradient separation of growth plate chondrocytes. *In vitro Cell Dev Biol* 1993;29A:117—9.
- Weisser J., Riemer S., Schmidl M. et al. Four distinct chondrocyte populations in the fetal bovine growth plate: highest expression levels of PTH/PTHrP receptor, Indian hedgehog, and MMP-13 in hypertrophic chondrocytes and their suppression by PTH (1-34) and PTHrP (1-40). *Exp Cell Res* 2002;279:1—13.
- O'Keefe R.J., Rosier R.N., Puzas J.E. Differential expression of biological effects in maturationally distinct subpopulations of growth plate chondrocytes. *Connect Tissue Res* 1990;24:53—66.
- Homandberg G.A., Davis G., Maniglia C. et al. Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments causes cleavage of aggrecan at the same site as found in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartilage* 1997;5:450—3.
- Yasuda T., Poole A.R. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway. *Arthr Rheum* 2002;46:138—48.
- Четина Е.В., Пул А.Р. Способность фрагмента коллагена 2 типа индуцировать расщепление коллагена и гипертрофию суставных хондроцитов. *Вестн РАМН* 2008;9:40—5.
- Yasuda T., Tchetina E.V., 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.
- Tchetina E.V., Kobayashi M., Yasuda T. et al. Chondrocyte hypertrophy can be induced by a cryptic sequence of type II collagen and is accompanied by the induction of MMP-13 and collagenase activity: implications for development and arthritis. *Matrix Biol* 2007;26:247—58.
- Tchetina E.V., Antoniou J., Tanzer M. et al. Transforming growth factor- β 2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E2 production. *Am J Pathol* 2006;168:131—40.
- Morales T.I., 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.
- Billinghurst 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.
- 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.
- 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.
- Zerega B., Cermelli S., Bianco P. et al. Parathyroid hormone [PTH(1-34)] and parathyroid hormone-related protein [PTHrP(1-34)] promote reversion of hypertrophic chondrocytes to a prehypertrophic proliferating phenotype and prevent terminal differentiation of osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:1281—9.
- Wealthall R.J. In vitro regulation of proliferation and differentiation within a postnatal growth plate of the cranial base by parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). *J Cell Physiol* 2009;219:688—97.
- Zuscik M.J., D'Souza M., Ionescu A.M. et al. Growth plate chondrocyte maturation is regulated by basal intracellular calcium. *Exp Cell Res* 2002;276:310—9.
- Mau E., Whetstone H., Yu C. et al. PTHrP regulates growth plate chondrocyte differentiation and proliferation in a Gli3 dependent manner utilizing hedgehog ligand dependent and independent mechanisms. *Dev Biol* 2007;305:28—39.
- Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells* 2008;25:1—6.
- Burdan F., Szumilo J., Korobowicz A. et al. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol* 2009;47:5—16.
- Komori T. A Fundamental transcription factor for bone and cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:813—6.
- Takeda S., Bonnamy J.-P., Owen M.J. et al. Continuous expression of Cbfa2 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 2001;15:467—81.