

Е.В. Четина

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

ПРИЗНАКИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ХОНДРОЦИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РАННИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ХРЯЩА У ПОЖИЛЫХ ЛЮДЕЙ

Контакты: Елена Васильевна Четина etchetina@mail.ru

Цель. Изучить соотношение уровней активности расщепления коллагена 2-го типа и характера экспрессии генов, отвечающих за дифференцировку хондроцитов, на участках здоровой хрящевой ткани и в области фокальных нарушений хряща на ранней стадии, подобных тем, что наблюдаются при остеоартрозе (ОА) у лиц пожилого возраста.

Материал и методы. Анализировали суставной хрящ дистальной поверхности бедренной кости коленного сустава, сочлененного с коленной чашечкой, имеющий фокальные нарушения, у пожилых людей. Расщепление коллагена 2-го типа оценивали, используя иммуноферментный анализ. Экспрессию генов определяли посредством ПЦР с обратной транскрипцией.

Результаты. Показано, что в зоне возрастных ОА-подобных нарушений хряща повышена активность расщепления коллагена 2-го типа. Это сопровождалось высокой экспрессией металлопротеиназ (ММП) 1, 14 (МТ1-ММП), агреканызы — дезинтегрин и ММП с тромбоспондиновым мотивом 1-го типа (ADAMTS) 5, цитокинов интерлейкинов (ИЛ) 1 α / β и фактора некроза опухоли α (ФНО α); а также генов, связанных с гипертрофией хондроцитов коллагена 10-го типа (COL10A1), ММП 13 и 9, индийского ежика (Ihh) и каспазы 3 в непосредственной близости от области нарушения. В то же время высокая экспрессия факторов роста, связанных с фазой пролиферации хондроцитов, а именно: пептида, родственного паратиреоидному гормону (PTHrP), ростового фактора фибробластов 2 (РФФ 2), трансформирующих факторов роста β 1/2 (ТФР β 1/2), — а также макромолекул матрикса коллагена 2-го типа (COL2A1) и агрекана наблюдалась как на соседних с нарушениями участках, так и на значительном расстоянии от центра нарушения. Однако на этих участках повышения активности расщепления коллагена не отмечено. На абсолютно здоровых участках хряща не наблюдалось ни усиленного расщепления коллагена, ни избыточной экспрессии исследованных генов.

Заключение. Наши исследования показали, что в зоне очень ранних возрастных ОА-подобных фокальных нарушений хряща происходит усиленное расщепление коллагена 2-го типа, которое сопровождается экспрессией генов, связанных с дифференцировкой хондроцитов в эмбриональной ростковой пластинке.

Ключевые слова: суставной хрящ, дифференцировка хондроцитов, экспрессия генов, фокальные нарушения

THE SIGNS OF DIFFERENTIATION OF CHONDROCYTES IN THE FORMATION OF EARLY CARTILAGE LESIONS IN THE ELDERLY E. V. Chetina

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

Contact: Elena Vasilyevna Chetina etchetina@mail.ru

Objective. To study the relationship between the activity of collagen type II cleavage and the pattern of expression of the genes responsible for chondrocyte differentiation in the areas of intact cartilaginous tissue and in those of early focal cartilage lesions similar to those observed in elderly people with osteoarthritis (OA).

Material and methods. The distal femoral articular surface of the knee joint that articulated with the patella and had focal lesions was examined in the elderly. Collagen type II cleavage was estimated by enzyme immunoassay. Gene expression was determined with reverse-transcription polymerase chain reaction.

Results. The activity of collagen type II cleavage was shown to be increased in the area of age-related OA-like cartilage lesions. This was accompanied by the high expression of collagenases of metalloproteinases (MMP) 1, 14 (MT1-MMP), aggrecanases — desintegrin and MMP with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) 5, the cytokines of interleukins (IL) 1 α / β and tumor necrosis factor- α (TNF- α), as well as the genes associated with chondrocyte hypertrophy of type X collagen (COL10A1), MMP 13 and 9, Indian hedgehog (Ihh) and caspase 3 in the immediate vicinity of a lesion area. At the same time, there was a high expression of growth factors associated with the proliferation phase of chondrocytes, namely: parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), transforming growth factor β 1/2 (TGF- β 1/2), as well as macromolecules of matrix of type II collagen (COL2A1) and aggrecan in both the areas adjacent to the lesions and at a considerable distance from their center. However, these areas showed no higher collagen cleavage activity. Neither higher collagen cleavage, nor excess expression of the genes examined were observed in the absolutely intact cartilage areas.

Conclusion. Our studies have indicated that the area of very early age-related OA-like focal cartilage lesions exhibits enhanced type II collagen cleavage that is attended by the expression of the genes associated with chondrocyte differentiation in the embryonic growth plate.

Key words: articular cartilage, chondrocyte differentiation, gene expression, focal lesions

При остеоартрозе (ОА) происходит дегенерация гиалинового хряща, что приводит к нарушению функционирования сустава и сопровождается болевым синдромом. Механизм возникновения заболевания в настоящее время неясен, что ограничивает возможности разработки эффективных лекарственных средств.

Деградация хряща при ОА включает разрушение внеклеточного матрикса (ВКМ), который состоит преимущественно из коллагена 2-го типа и агрекана. Этот процесс опосредуется металлопротеиназами матрикса (ММП), главным образом ММП 13, и, возможно, индуцируется усилением продукции цитокинов, таких как интерлейкин

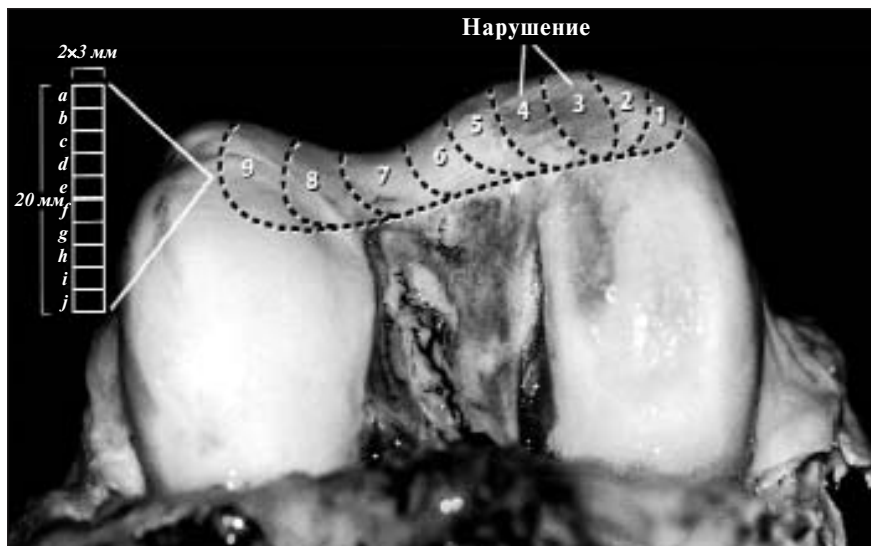


Рис. 1. Подготовка материала. Хрящ срезали с суставной поверхности дистального отдела бедренной кости полосками (1–9) шириной 3 мм и длиной 20 мм. Каждую полоску делили на 10 кусочков размером 2×3 мм (а–j) и анализировали, как описано в тексте

(ИЛ) 1 и фактор некроза опухоли α (ФНО α) [1–3]. На животных моделях показано, что на ранних этапах разрушение хрящевой ткани при ОА имеет фокальный характер и напоминает фокальные нарушения хряща у лиц пожилого возраста [4, 5].

Ранее мы обнаружили, что молекулярные изменения матрикса при фокальных нарушениях сходны с теми, что обнаруживаются при ОА и отличают его от нормального хряща [6]. В частности, в центре локального нарушения или вблизи него наблюдалась повышенная активность коллагеназы по сравнению с отдаленными участками.

Кроме того, при описании деградации ВКМ при ОА многие авторы отмечали признаки дифференцировки хондроцитов, а именно: клонирование клеток, экспрессию коллагена 10-го типа, аннексинов, щелочной фосфатазы, пептида, родственного паратиреоидному гормону (parathyroid hormone-related protein – PTHrP), и смерть клеток посредством апоптоза [7].

Поскольку замещение хрящевой ткани на костную в гипертрофной зоне ростовой пластинки при эмбриогенезе происходит также при участии коллагеназы, разрушающих ВКМ и продуцируемых хондроцитами, экспрессирующими маркеры гипертрофии, мы предположили, что разрушение коллагенового матрикса при раннем ОА может включать те же клеточные и регуляторные механизмы, которые управляют нормальной терминальной дифференцировкой и резорбцией ВКМ при развитии скелета. Ранее нами и другими авторами было показано, что пролиферация, созревание и гипертрофия хондроцитов в ростковой пластинке сопровождаются последовательной экспрессией генов, ответственных за ремоделирование ВКМ, а также регуляторных ростовых факторов [8].

В данной работе мы показываем, что на ранних стадиях повреждения хряща при старении человека усиление активности расщепления коллагена сопровождается увеличением экспрессии ММП в сочетании с активацией экспрессии генов, связанных с дифференцировкой хондроцитов в ростковой пластинке. Это предполагает, что дифференцировка хондроцитов является ранним этапом разви-

тия повреждений хряща при ОА.

Материал и методы. Суставной хрящ. Суставной хрящ человека срезали при вскрытии, менее чем через 12 ч после смерти лиц пожилого возраста, с дистальной поверхности бедренной кости коленного сустава, сочлененного с коленной чашечкой. Данные образцы были представлены здоровым хрящом, имели показатель 1 при гистологическом анализе по шкале Манкина [9], а также содержали очень ранние фокальные нарушения неизвестной природы, в которых хрящ имел гистологические показатели 3 или 4 по Манкину. Пробождения до кости не наблюдалось. Нами были проанализированы образцы ранних поврежденных хряща 37 умерших (средний возраст 58 лет; от 26 до 69 лет). Наиболее типичные результаты исследования ранних нарушений хряща трех умерших в возрасте 71, 58 и 51 года представлены ниже. Ни

один из умерших не подвергался химиотерапии, не имел диабета или сосудистой недостаточности нижних конечностей. Хрящ срезали полностью до субхондральной кости полосками шириной 3 мм и длиной 20 мм, от центральной части сустава к латеральной (рис. 1). Хрящевые полоски разрезали поперек на кусочки размером 2×3 мм и анализировали по отдельности гистологически (кусочки е и г), а также определяли активность расщепления коллагена (30–50 мг сырой массы хряща – кусочки с, f и i) и уровень экспрессии генов (100–200 мг сырой массы хряща – оставшиеся кусочки). Все хрящи оценивали гистологически на степень разрушения, используя систему Манкина [9].

Выделение общей РНК. Суммарную РНК выделяли из хрящей сразу после получения ткани. Хрящ помещали в раствор Д (4 М гуанидин изотиоцианата; 25 мМ цитрата натрия, pH 7,0; 0,5% лаурилсаркозина и 0,1 мМ 2-меркаптоэтанола). Далее образцы интенсивно перемешивали, используя вортекс, в течение 30 мин и центрифугировали (5000 g, 10 мин, 4 °C). Белки и нуклеиновые кислоты супернатанта осаждали равным объемом изопропанола в течение ночи при -20 °C. После центрифугирования при 10 000 g в течение 10 мин при 4 °C осадок ресуспендировали в буфере [10 мМ ТрисHCl (pH 8,0) 5 мМ EDTA, 1% SDS и 2 мг/мл протеиназы К (Life Technologies, Inc)] и инкубировали при 50 °C до исчезновения осадка. РНК экстрагировали смесью 1 объема фенола, 0,2 объема хлороформа и 0,1 объема 2 М ацетата натрия, pH 4,0. После центрифугирования (10 000 g, 20 мин при 4 °C) к водной фазе каждого образца добавляли равный объем 70% холодного этанола и помещали на микроколонку RNeasy (Qiagen). Дальнейшую очистку РНК проводили, используя набор RNeasy (Qiagen) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Обратная транскрипция (ОТ). В реакции ОТ использовали суммарную РНК хряща в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис HCl (pH 8,3), 75 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотрейтола (ДТТ), 50 мкМ каждого из дезоксинуклеотидов (dATP, dGTP, dCTP и dTTP), 200 нг случайных праймеров, 0,5 мкг РНК и 200 ед. Super-Script ТМП H-обратной транскриптазы (Invitrogen). Смесь инку-

Таблица 1

Праймеры для полимеразной цепной реакции

Коллагеназа 3 (ММП 13): D(1241–1259) GATAAAGACTATCCGAGAC, R(1369–1386) GAGTAACCGTATTGTTCG
Желатиназа В (ММП 9): D(139–156) GCAGAGGAATACCTGTAC, R(361–377) CACAACATCACCTACTG
Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (ТФР $\beta 1$): D(1171–1189) CGTGCTAATGGTGGAAAC, R(1321–1339) GCTCAAGTTAAAAGTGGAG
Индийский ежик (Ihh): D(794–810) CTGAGACTCTTTCACAG, R(1062–1080) CCATGAAGATACACCATTG
Основной ростовой фактор фибробластов (РФФ 2): D(901–920) CTCAGTTTGATAATTGGTC, R(1201–1218) CATTCGTTAGTCTACATG
Белок, родственник паратиреоидному гормону (PTHrP): D(233–253) GAAATCAGAGCTACCTCGGAG;
 R(317–336) GATGAGGGCAGATACCTAAC
Трансформирующий фактор роста 2 (ТФР 2): D(943–962) GATTGACGTCTCAGCAATG, R(1324–1343) CATATACCAGTGGTGATCAG
Sox 9: D(21–39) CATGAAGATGACCGACGAG, R(283–303) GTCAACGGCTCGAGCAAGAAC
Циклин В2: D(901–920) GAGGTTGATGTTGAACAGC, R(1351–1370) GGTCTATCTCATGAAACCTC
Каспаза 3: D(611–630) CATGGCGTGTCTATAAAATAC, R(821–840) CTTTGACGCTACTTTTCATG
Интерлейкин 1 α (ИЛ 1 α): D(312–332) GAGGAAGAATCATCAAGCC, R(627–646) GATACCCAAAACCATCACAG
Интерлейкин 1 β (ИЛ 1 β): D(710–728) GGAAAAGCGATTGTCTTC, R(844–863) GCCAGGATATAACTGACTTC
Фактор некроза опухоли α (ФНО α): D(633–650) GTCTCCTACCAGACCAAG, R(816–837) GAGTCTGGGCAGGTCTACTTTG
ММП 1: D(1095–1114) CA AAGGGATAAGTACTGGG, R(1211–1232) CTGAGGAAAACACTGGAAAAAC
MT1-ММП: D(2331–2348) CTCCTACTCTTTCTGGC, R(2516–2635) GTTAGAAGAGCTGAAACCCAG
ММП 3: D(1614–1630) GAATCTGTATCTTCCCG, R(1736–1753) CAGACAAGTGACTGTATC
ADAMTS 4 (Агреканыза 1): D(1329–1349) ACCACTTTGACACAGCCATTC, R(2000–2020) TGCTCTCGGACCTGTGGGGGT
ADAMTS 5 (Агреканыза 2): D(1302–1322) TGTGTCTGTGATGAAAGACGAT, R(1954–1972) CCATCTACCGCTCCGTCGAC
Катепсин К (CatK): D(638–659) GTGTGTCTGAGAATGATGCTG, R(905–925) CAGCAAAGGTGTGATTATG
Коллаген 2-го типа ($\alpha 1$) (COL2A1): D(949–970) GAACCCAGAAAACAACAATCC, R(1075–1095) GTTCGGACTTTTCTCCCCTCT
Коллаген 10-го типа ($\alpha 1$) (COL10A1): D(1655–1680) CAGGAATGCCTGTGTCTGCTTTTAC,
 R(1957–1980) GACCAGGTGTGGCTCCAGCTTCCC
Агрекан: D(6561–6583) TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC, R(6888–6910) TGTTCCTGCAATTACCACCTCC
Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC, R(927–950) AGCTCATTTCTGGTATG

бировавали при 42 °С 50 мин, а затем реакцию останавливали нагреванием при 70 °С в течение 15 мин в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованные в работе, представлены в табл. 1. ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем 10 мМ Трис HCl (pH 8,3), 1,5 мМ MgCl₂, 0,4 мМ каждого из дезоксинуклеотидов (dATP, dGTP, dCTP и dTTP), 0,8 мМ каждого праймера, 1 мкл кДНК и 2,5 ед. AmpliTaq ДНК-полимеразы (Perkin Elmer). Далее проводили 30 циклов амплификации. Каждый цикл включал денатурацию (95 °С, 1 мин), отжиг (50 °С, 1 мин) и синтез (72 °С, 5 мин). По окончании электрофореза в 1,6% агарозном геле продукты амплификации окрашивали бромистым этидием. GAPDH использовали в качестве эндогенного контроля. Используя серийные разведения сДНК при амплификации, следили, чтобы интенсивность полос на геле не превышала уровень насыщения. Каждый анализ проводили по меньшей мере 3 раза при разных разведениях каждого образца исходной сДНК. На рис. 2 и 3 представлен результат только одного разведения для всех образцов данного гена, где наблюдалось наиболее четкое различие в экспрессии. Результаты анализировали, используя программное обеспечение NIH 1.60 для определения интенсивности каждой полосы в пикселях. Фоновое значение сигнала автоматически вычиталось.

Продукт амплификации каждого фрагмента сДНК секвенировали для подтверждения его идентичности анализируемому гену. Для контроля отсутствия контаминации образцов РНК хромосомной ДНК также проводили ПЦР для образцов соответствующей РНК. Для предотвращения вариаций по эффективности реакцию ОТ и ПЦР проводили одновременно для всех образцов, используемых в данном эксперименте.

Определение активности расщепления коллагена 2-го типа коллагеназой с использованием фермент-зависимого иммуносорбентного метода (ELISA). Метод определяет содержание неопитота, генерируемого коллагеназами на

СООН-конце 3/4 фрагмента при расщеплении коллагена 2-го типа этими ферментами. Хрящи экстрагировали альфа-химотрипсином, чтобы, не переваривая, перевести в раствор денатурированный коллаген, включая карбокситерминальный неопитот COL2-3/4Cshort (C1,2C), образуемый при расщеплении коллагена 2-го типа коллагеназой. Его содержание в культуральной среде и альфа-химотрипсиновом экстракте хряща определяли посредством ELISA [2, 3]. Суммарный неопитот расщепления в хряще и среде рассчитывали сложением данных по анализу количества эпитопа, полученного при каждой смене среды, и в экстракте хряща. Результаты рассчитывали в пикомолях эпитопа на миллиграмм сырой массы хряща. Молекулярная масса стандартного пептида эпитопа равна 608 Да.

Результаты. Ранним нарушением хряща считался участок, где наблюдалась повышенная коллагеназная активность по сравнению с окружающей тканью, которая сопровождалась разрушением ткани не ниже степени 3 по Манкину. Участок здорового хряща (>2 полосок от повреждения) служил контролем по отношению к месту нарушения.

Образец поврежденного хряща бедренной кости мужчины в возрасте 71 года (табл. 2, см. рис. 2) гистологически представлял собой нормальный хрящ (степень 1 по Манкину), кроме полоски 3, локализованной в срединной части, где наблюдались ранние признаки дегенерации (степень 3 по Манкину). Усиленное расщепление коллагена 2-го типа посредством коллагеназы наблюдали только в полосках 3 и 4, имеющих наибольшее значение разрушения по Манкину. В области нарушения (полоски 3 и 4) проведенное тестирование выявило экспрессию генов ремоделирования ВКМ, а именно коллагена 2-го типа (преимущественно в полоске 4) и агрекана (полоска 4), а также коллагеназ ММП 13 и 1, а также ММП 3 и ADAMTS 5 (агреканыза 2) в полоске 4, где имелась нормальная гистология, но расщепление коллагена коллагеназой было усилено. MT1-ММП имела пик экспрессии в полоске 1, т. е. в области, примыкающей к повреждению, где также наблю-

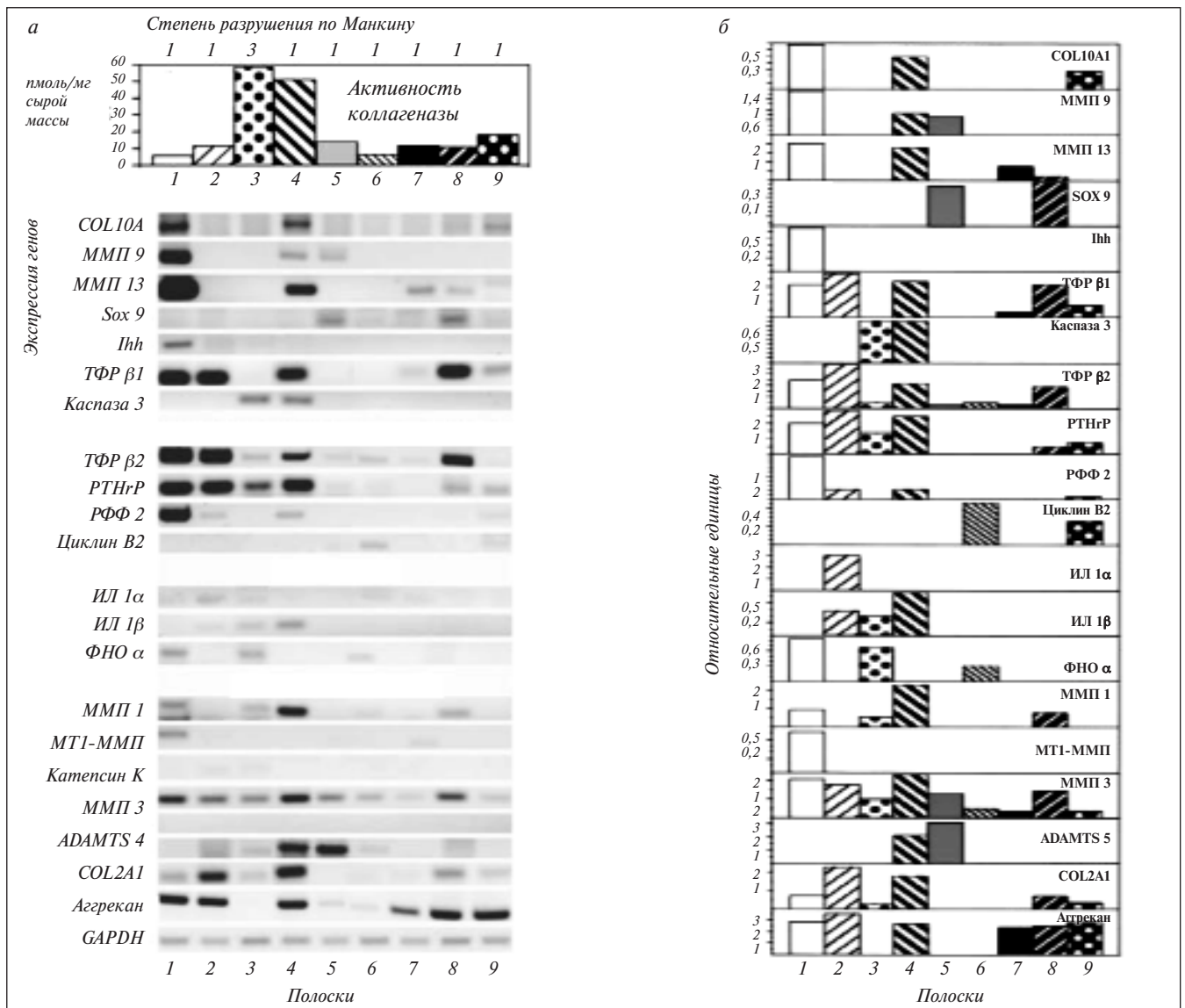


Рис. 2. Анализ экспрессии генов, расщепления коллагена 2-го типа и степени разрушения по Манкину (а), а также экспрессия тех же генов по отношению к GAPDH (б) в полосках хряща, срезанного с суставной поверхности дистального отдела бедренной кости мужчины, умершего в возрасте 71 год, имеющего возрастное фокальное нарушение хряща на ранней стадии

далась экспрессия ММП 13, 1 и 3. Катепсин К очень слабо экспрессировался в сайте нарушения и в непосредственной близости от него (полоски 2 и 3).

Процесс дегенерации ВКМ и его ремоделирования также сопровождался экспрессией генов, связанных с дифференцировкой хондроцитов. Так, экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией хондроцитов в ростковой пластинке [8], а именно РТНгР (полоски 1–4) и ростового фактора фибробластов (РФФ) 2 (преимущественно в полоске 1 и слабо в полосках 2 и 4), наблюдалась как внутри нарушения, так и вблизи него (полоски 1–4), а также, слабее, вдали от нарушения (полоски 8 и 9 для РТНгР и полоска 9 для РФФ 2), тогда как ММП, коллаген 2-го типа и агрекан обычно экспрессировались в обоих сайтах. Экспрессия РФФ 2 не обнаружена в полосках 5, 6 и 7. Ген ММП 9, связанный с терминальной дифференцировкой хондроцитов, слабо экспрессировался внутри нарушения и сильно — около него (полоска 1). Гены, которые наиболее сильно экспрессировались как в пролиферативной, так и в гипертрофной зонах бычьей ростковой пластинки, а имен-

но трансформирующий фактор роста (ТФР) 2 и ММП 13 [8], экспрессировались внутри нарушения и более сильно — вблизи него (полоски 1 и 2), а также вдали от нарушения (полоски 7 и 8). Хотя коллаген 10-го типа и ТФР 1 экспрессировались только в гипертрофной зоне ростковой пластинки, в процессе образования нарушения гиалинового хряща их экспрессия обнаружена как внутри (полоска 4) и вблизи (полоска 1), так и в более отдаленных от нарушения участках (полоска 9). Напротив, экспрессия Sox 9 наблюдалась четко в полоске 5 вблизи нарушения и в полоске 8 далеко от него, где также выявлялась экспрессия COL2A1. Экспрессия гена каспазы 3, которая указывает на готовность клеток к апоптозу, наблюдалась только внутри нарушения (полоски 3 и 4). Слабая экспрессия циклина В2 видна в полосках 6 и 9. Незначительная экспрессия цитокинов ИЛ 1β и ФНО α наблюдалась внутри нарушения и вблизи него (полоски 1–4). Экспрессия ИЛ 1 очень слабо была выражена вблизи нарушения в полоске 2.

В зоне наибольшего разрушения коллагена (полоска 3, степень 3 по Манкину) и наивысшей коллагеназной ак-

тивности мы не наблюдали высокой экспрессии генов, связанных с дифференцировкой хондроцитов по сравнению с полоской 4, расположенной в непосредственной близости от нарушения и имеющей высокую экспрессию гена и коллагеназную активность при низкой (равной 1) степени разрушения по Манкину. Поскольку эти образцы хряща имеют одинаковую экспрессию конститутивного гена «домашнего хозяйства» (GAPDH) и поэтому не различаются по количеству мРНК, мы считаем, что пролиферация и гипертрофия артикулярных хондроцитов, выявляемая по экспрессии соответствующих генов, – кратковременный процесс, который предшествует расщеплению коллагена и является аналогичным терминальной дифференцировке в гипертрофной зоне ростковой пластинки.

В дальнейшем были проанализированы ранние нарушения хряща дополнительно у двух других умерших; получены аналогичные результаты. Все данные по экспрессии генов внутри повреждений и вдали от них у 3 пациентов обобщены в табл. 2, из которой следует, что из всех генов только каспаза 3, дезинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновым мотивом 1-го типа (ADAMTS 5) селективно экспрессируются в 2/3 нарушений, но не в зонах, находящихся вдали от нарушения. Другие гены обнаруживаются в обеих зонах.

Далее мы сравнили профили экспрессии генов в полосках хряща, где коллагеназная активность «повышена» по сравнению с «фоновой» при суммировании этих данных по всем трем умершим с повреждениями хряща. Оказалось, что экспрессия генов, ассоциированных с терминальной дифференцировкой хондроцитов, более часто наблюдалась в полосках, где коллагеназная активность повышена (см. рис. 3). Так, каспаза 3 экспрессировалась только в полосках с активной коллагеназой. Экспрессия COL10A1, MMP 1, ADAMTS 5, ИЛ 1 и 1α также была повышена в области увеличения коллагеназной активности. Напротив, 9-й бокс, определяющий половую область Y (Sox 9), TФP β1/2, ФНО α и агрекан показали меньшую экспрессию там, где коллагеназная активность повышена. По другим генам существенной разницы не наблюдалось.

Обсуждение. Основу поддержания целостности суставного хряща составляет ремоделирование ВКМ хондроцитами. Ранний ОА характеризуется фокальными нарушениями хряща с потерей матрикса, вызванной механизма-

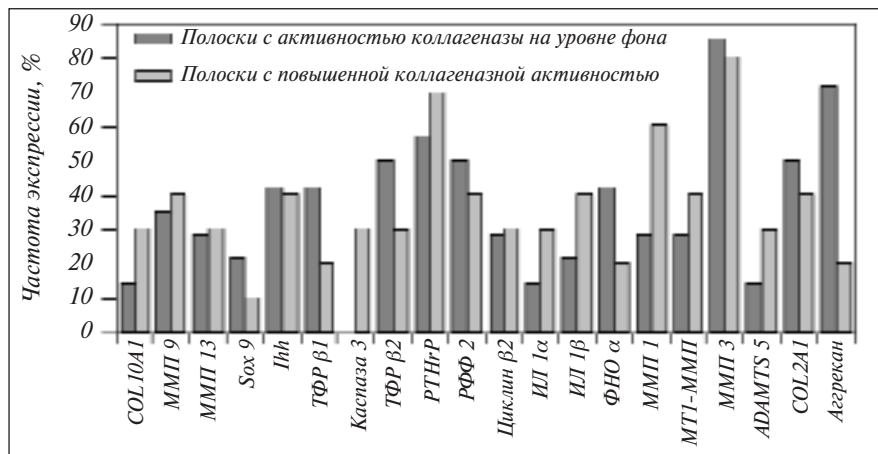


Рис. 3. Частота распределения экспрессии генов в полосках хряща, срезанного с суставной поверхности дистального отдела бедренной кости. Полоски разделены на 2 группы, характеризующиеся либо «фоновой» (n=14), либо «повышенной» (n=10) коллагеназной активностью. Полоски хряща, в которых наблюдали повышенную коллагеназную активность, – серого цвета. Проценты рассчитывали как отношение числа полосок, где наблюдалась экспрессия гена, к общему числу полосок в каждой группе

Таблица 2

Суммарные данные по экспрессии генов в области ранних фокальных нарушений у трех пациентов

Показатель	Экспрессия					
	в области нарушения или вблизи него			вдали от нарушения (>2 полосок)		
Возраст, годы	71	58	51	71	58	51
Гены						
COL10A1	+	+	–	+	–	–
MMP 9	+	+	+	–	–	+
MMP 13	+	–	+	+	–	–
Sox 9	+	+	–	+	+	–
Ihh	–	+	+	–	+	+
TФP β1	+	–	+	+	–	+
Каспаза 3	+	–	+	–	–	–
TФP β2	+	–	–	+	–	+
РТНгР	+	+	+	+	+	+
РФФ 2	+	–	+	+	–	+
Циклин В2	–	–	+	+	–	+
ИЛ 1α	+	–	–	–	–	–
ИЛ 1β	+	+	+	–	–	+
ФНО α	+	–	+	–	–	+
MMP 1	+	+	+	+	–	–
МТ1-ММП	–	+	+	–	–	+
MMP 3	+	+	+	+	+	+
ADAMTS 5	+	–	+	–	–	–
COL2A1	+	–	+	+	–	+

ми, которые включают усиление протеолиза и синтез матрикса одновременно [6]. Общепринятая рабочая гипотеза, объясняющая механизм разрушения хряща при ОА, заключается в нарушении баланса анаболических и катаболических процессов с преобладанием последних. При этом активируются протеиназы матрикса вследствие усиленной продукции цитокинов, таких как ИЛ 1β и ФНО α, а также нарушается баланс соотношения уровней протеазы и ингибитора, которые приводят к усилению активности MMP [10]. Результаты, представленные в данной статье, свиде-

тельствуют о том, что локальное увеличение активности ММП происходит в ответ на повышение экспрессии коллагеназ ММП 13 и 1, а также сопровождается экспрессией ADAMTS 5, ИЛ 1 α/β , но не ФНО α . Это ассоциируется с очень ранними дегенеративными изменениями хряща (регистрируемыми гистологически) и с терминальной дифференцировкой хондроцитов, экспрессирующих COL10A1 и каспазу 3, и означает, что резорбция ВКМ при участии этих протеиназ и цитокинов является ранней стадией в патологии разрушения гиалинового хряща и тесно связана с изменениями фенотипа хондроцитов.

Описанные нами ранее макроскопические фокальные нарушения, которые значительно более выражены, чем изученные здесь, характеризовались усиленным расщеплением коллагена посредством коллагеназ, приводящим к потере коллагена и протеогликанов [6]. Это сопровождалось усилением синтеза и кругооборота матрикса и градиентом гистологических изменений, которые распространялись из центра повреждения, в дальнейшем вовлекая здоровый хрящ [6]. Поэтому мы предположили, что если разрушение хряща является результатом дифференцировки хондроцитов, то начало этого процесса должно наблюдаться как очень раннее событие в процессе формирования фокального нарушения.

В предварительных исследованиях мы изучали профили экспрессии генов хондроцитами ростковой пластинки и локализовали 2 группы генов. Эти гены участвуют в пролиферации и терминальной дифференцировке (гипертрофии) хондроцитов [7]. При этом экспрессия РТНгР и РФФ 2 наблюдается только в пролиферативной зоне ростковой пластинки. В гипертрофной зоне найдены пики экспрессии следующих генов: COL10A1, сердцевинного связывающего фактора (Cbfa)1, ММП 9, Ihh и ТФР 1. Такие гены, как ТФР 2, ММП 13, циклин B2 и Sox 9, имели максимумы экспрессии как в пролиферативной зоне, так и (более мощный) в гипертрофной зоне ростковой пластинки [8]. При нормальной эндохондральной оссификации гипертрофные хондроциты резорбируют ВКМ активными коллагеназами и другими ферментами, расщепляющими компоненты матрикса, а затем погибают в результате клеточного апоптоза, освобождая место для остеобластов, формирующих кость.

Настоящее исследование показывает, что те же гены, которые участвуют в дифференцировке эмбриональных хондроцитов, экспрессируются в зонах очень ранних фокальных нарушений хряща, выявляемых как зона повышенной активности расщепления коллагена 2-го типа (по сравнению с фоновым уровнем) совместно с ранней дегенерацией хряща (степень 3 и выше по Манкину). Анализ ранних фокальных нарушений хряща трех умерших показал, что расщепление коллагена часто было связано с зоной нарушения или усиливалось вблизи нее и сопровождалось экспрессией генов, связанных с дифференцировкой хондроцитов, а именно COL10A1 (2/3, т. е. у 2 из 3 исследованных), ТФР β 1 (2/3), Ihh (2/3), ММП 9 (3/3), каспазы 3 (2/3), РТНгР (3/3) и РФФ 2 (2/3). В менее поврежденных зонах и вдали от нарушения (>2 срезов от центра) гены поздней дифференцировки обычно не экспрессировались, включая каспазу 3, тогда как экспрессия ТФР β 2 (2/3), РТНгР (3/3) и циклина B2 (2/3) обычно наблюдалась. Коллагеназы ММП 1 (3/3) и МТ1-ММП (2/3) обычно экспрессировались в зоне нарушения и/или вблизи него, как и ADAMTS 5 (2/3), агреканы, способная расщеплять агреканы [11]. Экспрессия ММП 13 наблюдалась в

1/3 нарушений и в 1/3 образцов неповрежденного хряща. Цитокины ИЛ 1 β (3/3) и ФНО α (2/3) экспрессировались в зоне нарушения или вблизи него. ИЛ 1 обычно не экспрессировался. Следовательно, экспрессия коллагеназ, агреканы и провоспалительных цитокинов часто связана с разрушенными частями хряща, но наблюдается также не только в зонах повышенной активности расщепления коллагена. Экспрессия агрекана и COL2A1 обнаружена как в зоне повреждений, так и вдали от них.

Экспрессию каспазы 3 мы всегда наблюдали в гипертрофной и верхней пролиферативной зонах бычьей ростковой пластинки, где она коэкспрессировалась с ММП 13 (Четина Е.В., Пул А.Р., неопубликованные данные) и ассоциировалась с резорбцией внеклеточного матрикса. А при ранних возрастных ОА-подобных нарушениях хряща экспрессия каспазы 3 также всегда была связана с повышенной коллагеназной активностью. При этом, как и экспрессия ADAMTS 5, экспрессия каспазы 3 никогда не наблюдалась вдали от зоны нарушения.

В нормальном здоровом гиалиновом хряще наблюдаются очень низкая экспрессия коллагена 2-го типа, отсутствие экспрессии коллагенов 1, 3, 10-го типов, достаточно высокая скорость оборота агрекана и очень ограниченная репликация хондроцитов [12]. В нем отмечали также ограниченную экспрессию ТФР β 2, РТНгР, РФФ 2, инсулинового фактора роста (ИФР) 1 и Ihh, а также незначительную активность апоптоза [13]. Однако в нашем исследовании развития очень ранних нарушений хряща выявлялась достаточно высокая экспрессия этих генов, указывающая на то, что хрящ уже более не является нормальным.

Увеличенная активность расщепления коллагена на очень ранних стадиях нарушения хряща сопровождается выраженной экспрессией генов, связанных с дифференцировкой хондроцитов, тех же, что и в ростковой пластинке [8]. Следовательно, с суставными хондроцитами могут происходить фенотипические изменения, сходные с таковыми у хондроцитов ростковой пластинки в процессе терминальной дифференцировки.

Экспрессия генов, связанных с дифференцировкой хондроцитов, не сопровождавшаяся расщеплением коллагена и деградацией матрикса (степень 1 по Манкину) и наблюдаемая, например, в полоске 8 у 71-летнего мужчины, может происходить в результате изменения нагрузки и/или ремоделирования матрикса, которые могут предшествовать проявлению заболевания, характеризуемого повышением коллагеназной активности.

Превратятся ли эти предшествующие заболеванию изменения в постоянную патологию (ОА), зависит от того, смогут ли клетки вернуться к «норме» или будут продолжать свою дифференцировку в гипертрофное состояние, приводящее к разрушению матрикса и заболеванию. Те участки, в которых наблюдаются увеличенная коллагеназная активность, разрушение хряща, увеличение экспрессии COL10A1, каспазы 3, ADAMTS 5 и ИЛ 1 α/β и уменьшение экспрессии агрекана, могут представлять ранний этап заболевания.

В целом наши результаты свидетельствуют о сходстве процессов, происходящих в ростковой пластинке в процессе дифференцировки хондроцитов при эндохондральной оссификации, с теми, что наблюдаются при формировании возрастных фокальных нарушений хряща, подобных ОА. В обоих случаях разрушению хрящевого матрикса предшествует увеличение экспрессии генов, связанных с фазой пролиферации хондроцитов, а именно

РТНР, РФФ 2, ТФР $\beta 1/2$, а также с синтезом макромолекул матрикса COL2A1 и агрекана, которые наблюдались как в пролиферативной зоне ростковой пластинки [8], так и на соседних с нарушенным участках или на значительном расстоянии от центра фокального нарушения, на его ранней стадии. Напротив, в зонах активного разрушения матрикса, как в гипертрофной зоне ростовой пластинки [8], так и вблизи центра фокального нарушения, на раннем этапе его формирования наблюдался высокий уровень экспрессии коллагеназ ММП 1, 14 (МТ1-ММП), агреканызы ADAMTS 5, цитокинов ИЛ $1\alpha/\beta$ и ФНО α , а также генов, связанных с гипертрофией хондроцитов COL10A1, ММП 13, 9, Ihh и каспазы 3.

Заключение. Представленные результаты показывают, что на ранней стадии нарушения суставного хряща его деструкция включает увеличение активности расщепления коллагена и сопровождается экспрессией генов, связанных с дифференцировкой хондроцитов, как в эмбриональной ростковой пластинке. В близлежащих участках также наблюдаются процессы, сходные с ранними этапами дифференцировки. Обратимо ли это изменение — пока неясно. Следовательно, дифференцировка хондроцитов может предшествовать резорбции матрикса. Подавление экспрессии генов, связанных с дифференцировкой хондроцитов, может быть удачной терапевтической мишенью для предотвращения ОА, поскольку позволит сохранить хрящ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Poole A.R., Howell D.S. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz R.W., Howell D.S., Goldberg V.M., Mankin H.J., eds. Osteoarthritis: Diagnosis and Management. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 2001:29–47.
2. 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.
3. 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 (matrix metalloproteinase). *Arthr Rheum* 2000;43:673–82.
4. 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* 2003;7:639–51.
5. Huebner J.L., Otterness I.G., Freund E.M. et al. Collagenase-1 and collagenase-3 expression in guinea pig model of osteoarthritis. *Arthr Rheum* 1998;41:877–90.
6. Squires G.R., Pidoux I., Okouneff S. et al. The development of focal lesions in ageing human articular cartilage involves molecular changes in type II collagen and aggrecan characteristic of osteoarthritis. *Arthr Rheum* 2002;48:1261–70.
7. Poole A.R. Cartilage in health and disease. In: Koopman W., ed. Arthritis and Allied Conditions. A textbook of rheumatology. 14th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams&Wilkins, 2001:226–84.
8. 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 Res* 2003;18:844–51.
9. Mankin H.J., Dorfman H., Lipello L. et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;3:23–37.
10. Dean D.D., Azzo W., Martel-Pelletier J. et al. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989;84:678–85.
11. Caterson B., Flannery C.R., Hughes C.E. et al. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* 2000;19:333–44.
12. Aigner T., McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2002;14:578–84.
13. Kuhn K., D’Lima D.D., Hashimoto S. et al. Cell death in cartilage. *Osteoarthr Cartilage* 2004;12:1–16.

Поступила 18.02.10