

In vitro хондро-реституционная способность препарата Алфлутоп®, доказанная на культурах хондроцитов

Получено для публикации 01 февраля 2016 г.
Принято 31 марта 2016 г.

Лаура ОЛАРИУ^{1,2*}, Наталья ПЯТИГОРСКАЯ³, Бриндуса ДИМИТРИУ¹, Алексей ПАВЛОВ¹, Ана Мария ВАКАРУ¹, Андрей ВАКАРУ¹.

¹ S.C. Biotehnos S.A., 3-5 Gorunului Street, 075100-Otopeni, Ilfov, Румыния, Тел: +40317102402, Факс: +40317102400;

² Академия румынских ученых – член-корреспондент, 54 Splaiul Independentei 050094, Bucharest, Румыния; ³ I.M. Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, ул. Трубецкая, 8-2, Москва, 119991, Россия;

* Адрес для корреспонденции: S.C. Biotehnos S.A., 3-5 Gorunului Street, 075100-Otopeni, Ilfov, Румыния, Телефон: +40317102402, Факс: +40317102400; электронная почта: lolariu@biotehnos.com

Аннотация

Хрящ характеризуется ограниченной способностью к восстановлению, поэтому поиск новых лекарственных средств, которые стимулируют клеточный анаболизм и ингибируют распад белка, имеет научный приоритет. Эффект препарата Алфлутоп® на регенерацию клеток хряща изучали с использованием клеток CHON-001 (хондроциты хрящевой кости человека), стандартизированной модели функциональных исследований in vitro, а также на первичных клетках, выделенных из хряща кролика. Основными исследованными механизмами были: пролиферативный статус (последовательность клеточного цикла и пролиферация) - является репрезентативным для динамической регенерации клеток, и внеклеточное высвобождение TGF-β - ключевого белка в гомеостазе внеклеточного матрикса. Результаты подтверждают in vitro действие препарата Алфлутоп® на обновление хондроцитов, стимулируя пролиферацию клеток и модулируя внеклеточное высвобождение TGF-β. Действие на вышеуказанные клеточные метаболические пути обуславливает терапевтическую эффективность препарата при дегенеративном остеоартрозе.

Ключевые слова: восстановление хрящевой ткани, хондроцит, пролиферация, Алфлутоп®

1. Введение

Остеоартрит – это дегенеративное заболевание, которое характеризуется постепенной утратой целостности суставного хряща. Функциональные ограничения проявляются как следствие прогрессирующего повреждения хрящевой ткани, утолщения субхондральной пластины и пролиферации остеофибов (BUCKWALTER & al., 1998 [1]). На поздних стадиях заболевания развивается сосудистая инвазия и кальцификация суставного хряща, что приводит к ремоделированию кости. Воспаление возникает в перисуставной ткани и имеет умеренную интенсивность в сравнении с ревматоидным артритом. Процесс ремоделирования хрящевой ткани инициируется аномальным каскадом внеклеточной стимуляции, включая аутокринные и паракринные факторы, синовиальные стимулы и белковые компоненты из поврежденного матрикса. Гомеостаз протеогликанов серьезно нарушается вследствие патологического ответа клеток относительно анаболической и катаболической активности. Число хондроцитов уменьшается как следствие нарушенного апоптоза и пролиферации, тогда как клетки начинают стареть, теряя свою функциональность (SILVER & al., 2001 [2]). Кроме того, остеоартрит - это не просто локальное заболевание, вызванное механическим напряжением, но и генерализованное нарушение, при

котором различные взаимосвязанные гуморальные, метаболические, клеточные и молекулярные медиаторы способствуют прогрессированию дегенерации суставного хряща (ALCARAZ & al., 2013 [3]).

Пролиферация клеток имеет решающее значение для каждого гомеостаза и восстановления тканей, но прогрессирующее снижение числа клеток суставного хряща является известным признаком остеоартроза, связанного с уменьшенной пролиферативной способности в хондроцитах сустава. Эти наблюдения показывают, что суставные хондроциты не обладают необходимой пролиферативной способностью для того, чтобы эффективно поддерживать количество клеток в ответ на возрастные патологические изменения. Обновление клеток происходит медленно и создает более низкую способность реагировать на повреждения (VENEZIAN & al., 1998 [4]). Стимуляцию пролиферации хондроцитов можно рассматривать как терапевтическое решение для остеоартроза. Передача сигналов TGF- β участвует в широком спектре клеточной активности, как при физиологических, так и при патологических состояниях, регулируя экспрессию генов посредством нескольких сигнальных путей. В культивируемых хондроцитах TGF- β 1 стимулирует пролиферацию клеток и образование внеклеточного матрикса. Лечение с помощью TGF- β увеличивает синтез хрящевого матрикса, особенно агрекана. TGF- β увеличивает общий синтез гликозаминогликана в незрелом хряще, а не в зрелом хряще, поддерживая компоненты хрящевого матрикса в незрелом состоянии (SMITH & al., 2000 [5]). Через Smad-зависимый путь TGF- β индуцирует экспрессию агрекана в линиях хондрогенных клеток. В ответ на TGF- β Smad2 быстро фосфорилируется, что приводит к начальной активации гена агрекана. TGF- β одновременно усиливает экспрессию агреканазы и тем самым ускоряет обновление хрящевого матрикса. Помимо того, что TGF- β усиливает пролиферацию хондроцитов, он ингибирует терминальную дифференцировку хондроцитов и помогает хондроцитам оставаться в регипертрофической стадии (LI & al., 2005 [6]). TGF- β играет важную роль во всех фазах хондрогенеза, мезенхимальной конденсации, пролиферации хондроцитов, реструктуризации внеклеточного матрикса (синтез агрекана и коллагена типа II) и терминальной дифференцировки, являясь ключевым фактором хондрогенеза. TGF- β сильно стимулирует клеточную конденсацию, что также усиливает клеточную адгезию. После механической стимуляции хондроциты выделяют TGF- β посредством механизма аутокринной сигнализации. Интегрины, связывающие белки из внеклеточного матрикса, реагируют на этот сигнал. Комплекс рецепторов клеточной поверхности TGF- β генерирует определенные сигнальные каскады (например, TGF- β - SMAD), в которых упоминается терминальная дифференциация, участвующая в начале и прогрессировании разрушения хряща (DeLISE & al., 2000 [7]). Долгосрочная эффективность при остеоартрите предполагает необходимость применения многонаправленной терапии на основе сигнальных факторов и их влияния на специфические метаболические пути или определенные механизмы, начиная от пролиферативных процессов до образования структурного матрикса. Алфлутоп® - это препарат, содержащий экстракт небольших морских рыб, который используют для лечения дегенеративного остеоартрита. Наши экспериментальные исследования нацелены на несколько клеточных процессов (пролиферацию и внеклеточную сигнализацию TGF- β) с целью выделить молекулярные механизмы действия для препарата Алфлутоп®.

2. Материалы и методы

Культуры клеток:

CHON-001 - (ATCC® CRL-2846™) - нормальные хондроциты человека из длинной хрящевой кости. Клетки культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (ATCC - № по каталогу 30-2002) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, раствора антибиотика G-418 в концентрации 0,1 мг/мл в инкубаторе при температуре 37°C, относительной влажности 95% и 5 % CO₂. Клетки обрабатывали в течение 48 часов препаратом Алфлутоп® в разных концентрациях и 15 мкМ аскорбиновой кислоты (в качестве положительного контроля) и отделяли путем трипсинизации (Трипсин/ЭДТА 0,1 г% - Сигма)

Хондроциты, выделенные из хряща кролика (первичная культура) - Хондроциты были выделены из фрагментов хряща, иссеченных из длинных костей 2-летних самцов кроликов путем ферментативного переваривания с помощью коллагеназы II (BRITTBURG & al., 2001 [8]),

ZHONGHUA & al., 2005 [9]). Полученные первичные хондроциты были высеяны в DMEM с высоким содержанием глюкозы (ATCC - № по каталогу 30-2002) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и раствора антибактериальных и антимикотических агентов при температуре 37°C, влажности воздуха 95% и 5% CO₂. Во время второго пассажа клетки распределяли на 6 луночных планшетах с плотностью 100000 клеток/лунку, при культивировании выдерживали в течение 48 часов, а затем обрабатывали препаратом Алфлутоп® в различных концентрациях еще в течение 48 часов.

Химические вещества и реактивы: Набор реактивов Cycle TEST PLUS DNA (BD PHARMINGEN); набор для детекции пролиферации клеток Cell Trace CFSE (Invitrogen); тест – система для определения растворимых факторов BD Cytometric Bead Array (CBA): набор *Human TGF-β Single Plex Flex* и набор буферного раствора протеина (BD Pharmingen).

Оборудование: Проточный цитометр FACS CANTO II (Becton - Dickinson) с программным обеспечением DIVA 6.1 и FCS Express.

Методы:

ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК - КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНЕРАЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ - оценивают методом количественного определения с помощью флуоресцентного окрашивания CFSE (карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидиловый эфир), красителя на основе флуоресцеина, проникающего в клетки, который ковалентно присоединяется к цитоплазматическим компонентам клеток, приводя к равномерной яркой флуоресценции (LYONS, 2000 [10]). При делении клеток краситель равномерно распределяется между дочерними клетками, что обеспечивает разрешение для почти восьми циклов клеточного деления во время проточной цитометрии.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА - Выделение и маркирование ядер в клеточных суспензиях проводят с использованием реактива Cycle TEST PLUS DNA (BD PHARMINGEN). Измерение количества ДНК методом проточной цитометрии возможно только благодаря специфической маркировке ДНК люминисцентным красителем иодида пропидиум (PI). Интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству красителя, соответствуя количеству ДНК, с которым она была связана. В гистограмме распределения для количества ДНК/ нормальной популяции наблюдается следующее: первый пик, соответствующий фракции клеток, который находится в фазе G₀/G₁, содержит количество ДНК диплоидных клеток (2N); второй пик, обнаруженный на двойном расстоянии относительно первого, который представляет клеточную фракцию в фазах G₂ + M, имеет количество ДНК тетраплоидных клеток (4N); площадь между двумя пиками, представляющими клетки в фазе синтеза S, имеет промежуточное содержание нуклеиновых кислот (RABINOVITCF1, [11], Darzynkiewicz & al., 2010 [15]).

ОЦЕНКА TGF-β – с помощью тест-системы BD™ Cytometric Bead Array (CBA), приложения для проточной цитометрии, которое позволяет пользователям количественно определять несколько белков одновременно. Система использует широкий динамический диапазон обнаружения флуоресценции, предлагаемый методом проточной цитометрии и микросферами, покрытыми антителом, для эффективного захвата анализируемого вещества. Реактив обнаружения, входящий в состав набора, представляет собой смесь фикоэритрина (ФЭ) -конъюгированных антител, которые обеспечивают флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству связанного анализата (в нашем случае TGF- β).

Анализ полученных результатов (стандартная кривая для цитокинов и расчет концентрации) выполняют с помощью программного обеспечения FCAP Beads Array.

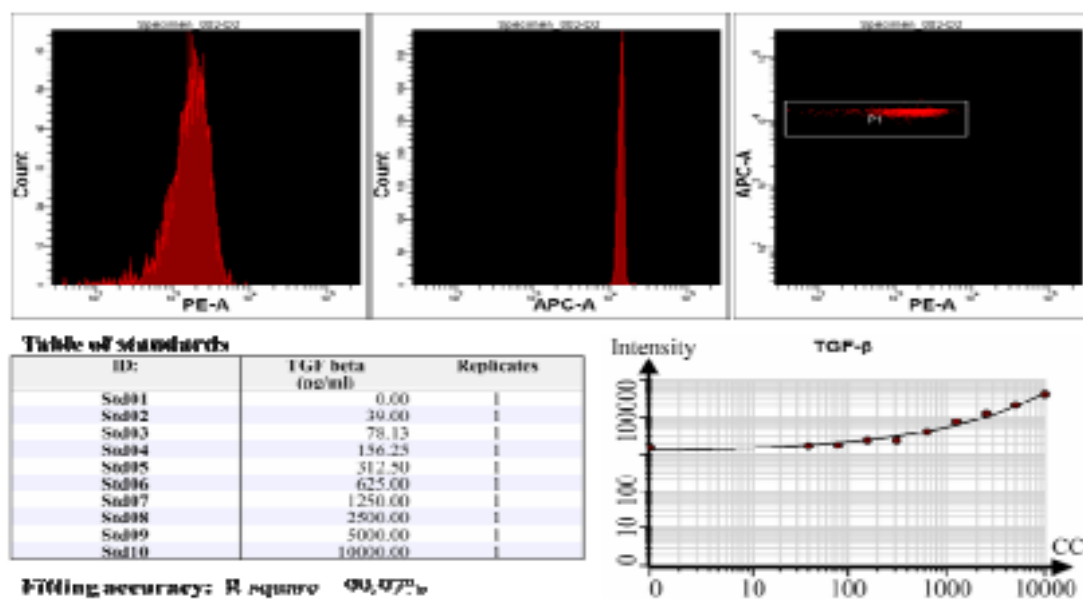


Рисунок 1. Методика оценки TGF- β как внеклеточного растворимого белка – метод использования флуоресцентных микросфер захвата

Когда микросферы захвата и детектирующий реагент инкубируют с неизвестным образцом, содержащим распознанные аналиты, образуются сэндвич-комплексы (микросфера захвата + аналит + детектирующий реагент). Эти комплексы можно измерить с использованием проточной цитометрии для идентификации частиц с флуоресцентными характеристиками микросферы и детектора. Детекцию выполняли с использованием координат APC-A/PE-A (Рисунок 1).

Статистика

Эксперименты выполняли в трех повторениях, и учитывали средние значения. Графические представления включают стандартные отклонения между экспериментами. Статистику выполняли с использованием t-критерия, где * означает p-значение <0,05, ** означает значение p <0.01 и *** означает p-значение <0,005.

3. Результаты и выводы

Для демонстрации действия препарата Алфлутоп® в качестве хондропротекторного средства, разрабатывали экспериментальные модели, выделяя пролиферативный статус хондроцитов и гомеостаз структурного белка, модулированного TGF- β . Одной из используемых клеточных моделей была стандартизированная клеточная линия нормальных человеческих хондроцитов костной ткани, CHON-001. Другой линией клеток была первичная культура недавно выделенных клеток из хряща кролика, которые имеют преимущества для лучшего поддержания физиологических особенностей первичного источника, хряща. Аскорбиновая кислота в концентрации 15 мкМ считалась положительным контролем, являясь активатором пролиферации хондроцитов (KIMLL & al., 2003, [12]).

А. Хондропротекторный эффект препарата Алфлутоп®, оценку которого осуществляли с использованием стандартизированной клеточной линии CHON-001.

Пролиферативный статус исследовали двумя дополнительными методами: скоростью деления и последовательностью генерации пролиферации - количественно определенной с помощью пролиферативного индекса (ПИ) и распределения фаз клеточного цикла, особенно в фазе S (синтез ДНК) и G2/M (начало митоза). Важно оценить общий процент клеток в стадии синтеза ДНК и митоза (%S +%G2/M), которые определяют пролиферативный индекс и предлагают правильное изображение процесса размножения клеток (GRIMES & al, 1997, [13]).

Результаты представлены на рисунке 1 (изменение индекса пролиферации) и на рисунке 3 (гистограммы %S + %G2/M и ДНК для контроля/препарата Алфлутоп®). В экспериментах используется также аскорбиновая кислота как хорошо известный стимулятор пролиферации.

Препарат Алфлутоп модулирует пролиферацию хондробластов

Эффект препарата Алфлутоп на % клеток в репликационной (S) и митотической (G2/M) клеточного цикла

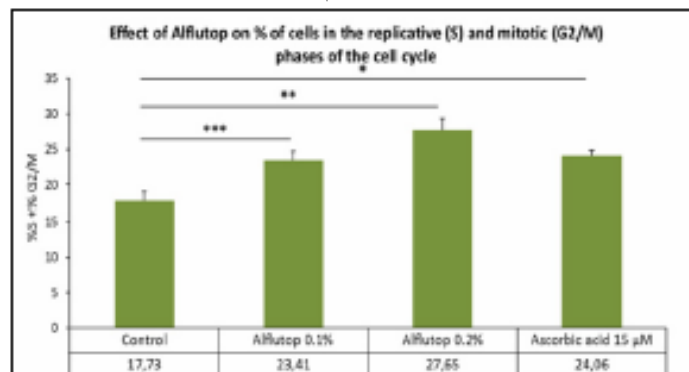
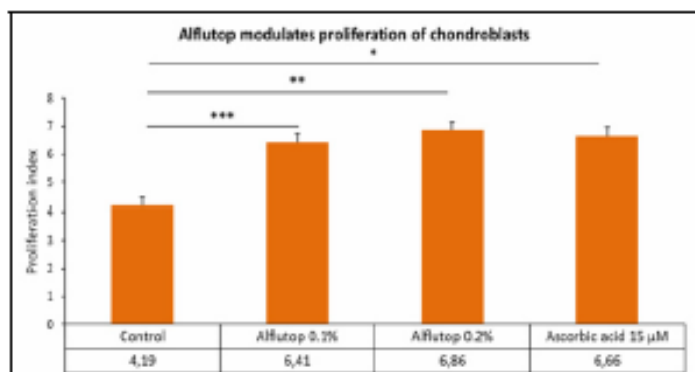


Рисунок 2. Последовательность генерации пролиферации, оцениваемая с помощью индекса пролиферации-ПИ

Рисунок 3. Динамика клеточного цикла хондроцитов линии клеток CHON-001, модулированная препаратом Алфлутоп®

Препарат Алфлутоп® улучшает пролиферативный статус хондроцитов, повышая ПИ в зависимости от дозы и значимо у 53% (для препарата Алфлутоп 0,1%), и 64%, соответственно (для препарата Алфлутоп 0,2%) по сравнению с контролем клеток (рисунок 2).

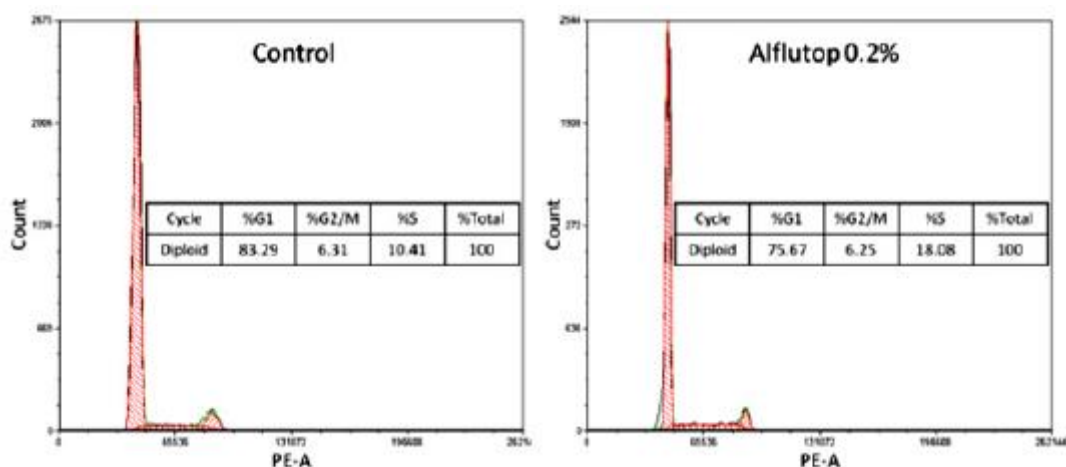


Рисунок 4. Гистограммы ДНК, которые демонстрируют эффект препарата Алфлутоп® на модуляцию клеточного цикла хондроцитов

Другой дополнительный метод, основанный на распределении клеточного цикла, показывает значительно увеличенный синтез ДНК и большее количество клеток, начинающих митоз, равное 32% для препарата Алфлутоп 0,1% и 56% для препарата Алфлутоп 0,2% по сравнению с контролем клеток (рис.3,4). Этот процесс находит свое отражение в восстановлении количества хондроцитов и их функциональности, которые помогают поддерживать и улучшать баланс между компонентами суставного хряща.

Эффект препарата Алфлутоп на внеклеточное высвобождение TGF-β клетками CHON-001

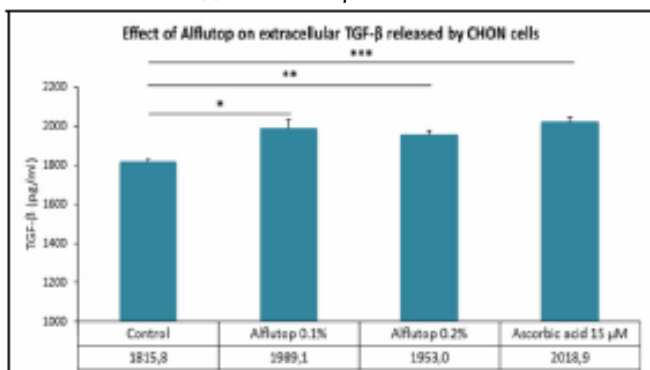


Рисунок 5. Внеклеточное высвобождение TGF-β (метод СВА) в линии клеток CHON-001, обработанных препаратом Алфлутоп®

Эффект препарата Алфлутоп на размножение первичных хондроцитов

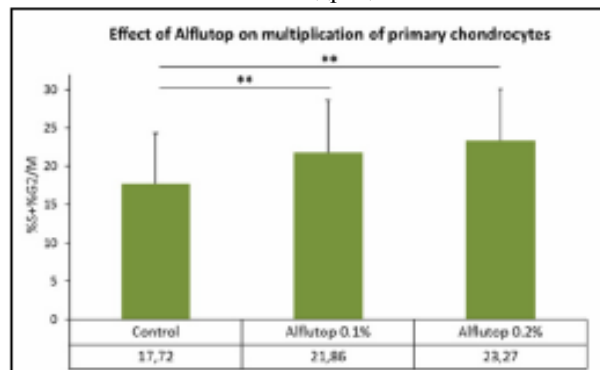


Рисунок 6. Модуляция размножения первичных хондроцитов (%S и %G2/M фаз клеточного цикла)

Для проверки гипотезы о том, что препарат Алфлутоп® может регулировать гомеостаз внеклеточного матрикса посредством восстановления баланса анаболических/ катаболических процессов белков, было обнаружено **внеклеточное высвобождение TGF-β**. На рисунке 5 показаны результаты последовательных экспериментов, подтверждающих значительную активацию TGF-β, равную 7%, индуцированную препаратом Алфлутоп® в сравнении с контролем клеток. Аскорбиновая кислота, которую использовали в качестве активатора клеточного метаболизма, повышала внеклеточное высвобождение TGF-β на 10% в сравнении с контролем клеток. Небольшую, но значимую, активацию TGF-β следует рассматривать в отношении общего гомеостаза клетки. Внезапное высвобождение большого количества внеклеточного TGF-β может разрушить тонкий баланс синтеза/ деградации белка и привести к аномальному окостенению.

В. Хондропротекторный эффект препарата Алфлутоп®, который оценивали на первичных клетках из хряща кролика

Хондро-реституционный эффект препарата Алфлутоп® на стандартизованной клеточной линии CHON-001 оценивали на первичных клетках, выделенных из хряща кролика с целью подтвердить ранее наблюдаемое действие. Таким образом, последовательность фаз клеточного цикла оценивали в конечной контрольной точке через 48 часов инкубации с препаратом Алфлутоп®. В таблице 1 и на рисунке 6 представлены события клеточного цикла, модулированные препаратом Алфлутоп®, и процент изменения двух фаз пролиферативного клеточного цикла: S (синтез ДНК) и G2/M (начало митоза).

Таблица 1. Распределение клеточного цикла, модулированное препаратом Алфлутоп®

	%G0/G1 (среднее)	%S (среднее)	%G2/M (среднее)	%S+%G2/M	Индекс изменения %
Контроль	81,97	5,78	11,94	17,72	-
Алфлутоп 0.1%	78,13	7,92	13,94	21,86	25,16
Алфлутоп 0.2%	76,73	8,54	14,73	23,27	33,77

Препарат Алфлутоп® доказал также свою эффективность в регуляции первичного клеточного цикла хондроцитов. Он стимулирует синтез ДНК и прогрессирование митоза на 25% - 33% в зависимости от дозы. Эти наблюдения коррелируют с результатами, полученными для стандартизованной клеточной линии CHON-001, и указывают на то, что препарат Алфлутоп® может быть эффективным средством для стимуляции пролиферативной способности хондроцитов,

значительно влияя на патологические изменения хряща (механические или возрастные). Результаты, представленные в этом исследовании вместе с нашими предыдущими выводами об *in vitro* модуляции важных медиаторов воспаления (IL6, IL8, VEGF), индуцированных препаратом Алфлутоп® (OLARIU & al., 2015, [14]), подтверждают хондро-реституционную способность данного препарата и определяют его многонаправленное клеточное действие при остеоартрите.

Выводы

Линия клеток хондроцитов CHON-001 представляет собой эффективную, воспроизводимую модель *in vitro*, актуальную для структурных и функциональных остеоартрических изменений, что доказывают сравнительные и подтвержденные результаты, полученные при использовании первичных хондроцитов. Дегенеративное заболевание суставов включает сложную патологию с внутренними и внешними модуляторами, одним из наиболее репрезентативных механизмов прогрессирования которых является медленная скорость деления хондроцитов, основных клеточных компонентов, ответственных за гомеостаз хряща. Препарат Алфлутоп® индуцирует стимуляцию пролиферации хондроцитов как на стандартизированной линии человеческих клеток, так и на недавно выделенных клетках из хряща кролика, что доказывает его положительное влияние на основной процесс повреждения хряща. Более того, результаты двух разных методов, демонстрирующих корреляционные процессы, сходятся в отношении положительного эффекта препарата Алфлутоп® на клеточную пролиферацию. Кроме того, мы заметили, что обработка клеток CHON-001 препаратом Алфлутоп® модулирует соответствующее высвобождение TGF- β , основу внеклеточной передачи сигнала для синтеза структурных белков. Все эти механизмы подтверждают хондро-реституционный эффект этого препарата, стимулирующего клеточное размножение и поддержку внеклеточной структуры.

Литература