

IN VITRO ЭФФЕКТ ПРЕПАРАТА АЛФЛУТОП® НА НЕКОТОРЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ВОСПАЛЕНИИ ПРИ ОСТЕОАРТРИТЕ

Получено для публикации 15 сентября 2015 г.
Принято 1 декабря 2015 г.

Лаура ОЛАРИУ^{1,2}, Бриндуса ДИМИТРИУ¹, Эмилия БУСЭ¹, Наталия РОСОИУ^{1,2}.

¹ S.C. Biotechnos S.A., 3-5 Gorunului Street, 075100-Otopeni, Ilfov, Румыния, Тел: +40317102402, Факс: +40317102400, e-mail: lolariu@biotechnos.com

² Академия румынских ученых, 54 Splaiul Independentei 050094, Bucharest, Румыния, электронная почта: natalia_rosoiu@yahoo.com, тел: 0722737516; +40241605012

Аннотация. Биохимическое разнообразие и сложные взаимоотношения между механизмами, участвующими в развитии остеоартрита, предполагают использование таргентной терапии по нескольким метаболическим путям для достижения превосходной долгосрочной эффективности. После открытия цитокинов в качестве гуморальных факторов, которые модулируют соединительную ткань, было открыто новое понимание терапии посредством прекращения воспаления с помощью синтетических/ природных агентов. Цель наших исследований заключается в том, чтобы подчеркнуть эффект препарата Алфлутоп® на растворимые факторы, участвующие в прогрессировании воспаления (IL6, IL8 и VEGF), коррелируя ответ гена с фенотипической экспрессией. Воспаление индуцировали в хондроцитах человека (CHON-001) тремя типами провоспалительных стимулов: TNF α , IL1 β , ФМА (форболмиристатацетат), и анализировали внеклеточное высвобождение цитокинов IL6, IL8 и проангиогенного фактора VEGF. (Метод проточной цитометрии и количественной ПЦР с детекцией в реальном времени). Результаты подтвердили противовоспалительный эффект «in vitro», который оказывает Алфлутоп® на хондроциты посредством механизмов, включающих сигнальный путь цитокинов на генотипическом и фенотипическом уровне.

Ключевые слова: Алфлутоп®, IL6, IL8, VEGF, противовоспалительные эффекты.

Введение

Остеоартрит (ОА) является заболеванием суставов, вызванным механическими, биохимическими и генетическими факторами, включая дегенерацию суставного хряща, ограниченное внутрисуставное воспаление и изменения субхондральной кости. Современные фармакологические вмешательства, направленные на уменьшение хронической боли, недостаточны, а также не существует доказанной терапии, изменяющей течение болезни. Хондроциты, уникальный клеточный компонент суставного хряща взрослого человека, реагируют на структурные изменения в окружающем хрящевом матриксе, определяя важную цель для терапевтического вмешательства. Тем не менее, способность хондроцита в суставе взрослого человека восстанавливать нормальную структуру хрящевого матрикса ограничена, и повреждение становится необратимым, если не прервать деструктивный процесс [1]. Идентификация методов раннего лечения или сохранения нормального гомеостаза имеет ключевое значение, а блокирование или реверсия структурного повреждения является перспективным терапевтическим вмешательством [2].

Деградация сустава сопровождается явлениями в клетках и молекулах, которые приводят к прогрессированию этой дисфункции посредством прямых и косвенных механизмов. В нормальных условиях хондроциты поддерживают динамическое равновесие между синтезом и деградацией компонентов ВКМ. Однако, при остеоартрите матричное равновесие нарушается, что приводит к постепенной утрате хрящевой ткани, клональному расширению клеток в истощенных областях, индукции окислительных состояний в стрессовой клеточной среде и, в конечном счете, апоптозу хондроцитов. Отсутствие баланса метаболизма хондроцитов вследствие чрезмерного продуцирования воспалительных цитокинов и ферментов, разрушающих матрикс, в сочетании с подавлением анаболических факторов, в конечном итоге приводит к разрушению внеклеточного матрикса и последующей деградации хряща. Окислительный стресс, вызываемый активными формами кислорода (АФК), дополнительно нарушает хрящевой гомеостаз и способствует катаболизму посредством индукции гибели клеток, разрушения компонентов матрикса, повышения продуцирования латентного матрикс-разрушающего фермента, ингибирования синтеза ВКМ и окисления внутриклеточных и внеклеточных молекул [2].

Учитывая провоспалительный уровень развития остеоартрита, выделяют следующие типы внеклеточных сигнальных факторов: провоспалительные цитокины, металлопротеиназы матрикса, факторы роста, медиаторы нейронов [3].

Целостность хряща сохраняется, благодаря балансу между анаболическими и катаболическими процессами, под управлением цитокинов.

Считается, что катаболизм хряща, пораженного остеоартритом, включает в себя действие провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 1 (IL-1) и фактор некроза опухолей альфа (TNF-α) [4]. Хондроциты также секретируют множество иммунокомпетентных цитокинов, включая IL-1 бета, IL-6, IL-8, которые могут взаимодействовать между собой для регулирования клеточного метаболизма [5]. Цитокины, например, IL-1 и TNF-альфа (фактор некроза опухолей альфа), продуцируемые активированными синовиоцитами, мононуклеарами или самим суставным хрящом, значительно повышают экспрессию генов металлопротеиназ (MMP) [6].

TNF α взаимодействует с IL6 и вызывает деградацию протеогликанов из внеклеточного матрикса, опосредованную агреканазой [7]. Т-лимфоциты являются основными клеточными активаторами, ответственными за иницирование воспалительных процессов, особенно посредством IL2, IL3, IL4, TNF β , IFN- γ . IL4 является противовоспалительным цитокином, секретируемым Т-лимфоцитами, с глубоким воздействием на внутренние механизмы регуляции прогрессирования воспалительного состояния, предупреждая, самостоятельно или с помощью IL10, повреждение хрящевой ткани [8].

Ангиогенез - это еще одно явление воспаления синовиальной ткани. Он начинается на ранних стадиях заболевания и может протекать бессимптомно, при котором IL8, VEGF или FGF β действуют как проангиогенные маркеры. Увеличивающееся число наблюдений указывает на то, что VEGF, который, как долгое время считалось, является эндотелий-специфичным на основе локализации его рецептора, может также воздействовать на неэндотелиальные типы клеток, проводя активную трансдукцию сигнала.

Имеются последовательные доказательства того, что VEGF участвует в патологической неоваскуляризации хряща с увеличением фактора в синовиальных жидкостях, возникающих в результате ревматоидного артрита. Наличие VEGF-рецептора и функциональной сигнальной трансдукции в гипертрофических хондроцитах рассматривали в свете возможного дополнительного дифференцирующего или морфогенного эффекта VEGF в образовании эндохондральной кости [9].

Экспрессия многих генов, кодирующих провоспалительные медиаторы и ферменты, разрушающие матрикс, регулируется фактором транскрипции, ядерным фактором-каппа В (NF- κ B). Подавление каскадов, активирующих NF- κ B, может эффективно снижать экспрессию провоспалительных медиаторов [10].

Нарушенный гомеостаз и фенотипическая модуляция в хондроцитах во время иницирования и прогрессирования остеоартрита сосредоточили текущие исследования на выявлении новых фармакологических агентов, которые могут ингибировать продуцирование провоспалительного медиатора с меньшим количеством побочных эффектов [11]. Сообщалось о нескольких не фармакологических продуктах, действующих на путь трансдукции NF- κ B и способствующих здоровью сустава. К этим продуктам относятся неомыляемые вещества из авокадо/сои, которые используются в Европе для лечения остеоартрита. Этот продукт подавляет экспрессию гена IL-1 β , TNF- α , ЦОГ-2 и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), а также продукцию PGE2 и оксида азота в клетках тканей бычьих и человеческих суставов [12].

Сюда же относится использование таких соединений как глюкозамин, хондроитина сульфат, пентозана полисульфат, растительные или животные экстракты, которые по отдельности или в комбинации могут взаимодействовать с медиаторами остеоартрита [13].

Целью наших исследований было выявить молекулярные эффекты препарата Алфлутоп® на противовоспалительные и антиангиогенные пути, включающих передачу сигналов цитокинов. Алфлутоп® является широко используемым препаратом для лечения дегенеративного остеоартрита, воспалительного ревматизма или посттравматического воспаления костной ткани.

Для создания точной модели «in vitro», мы выбрали стандартную линию хондроцитов, CHON-001, полученную из длинной кости, представляющую специфические свойства суставной субхондральной ткани и обеспечивающие очень хорошую межэкспериментальную воспроизводимость. Мы контролируем фенотип и экспрессию генотипа с помощью современных методов, например, количественный анализ методом проточной цитометрии с использованием мультиплексных микросфер и количественная ПЦР с детекцией в реальном времени для генов основных молекул (IL6, IL8, IL1 β).

Мы разрабатываем следующие серии экспериментов в разных условиях:

- **Нестимулированные клетки**
- **Стимуляция TNF- α** - системный стимул, один из двух основных цитокинов, участвующих в физиопатологии ОА.

- **Стимуляция ФМА** - Стимулирование с помощью форболмиристацетат (ФМА) описано для активации протеинкиназы С и активирования NADPH-оксидазы, которые приводят к образованию супероксидного аниона, одного из основных видов реактивного кислорода [14]. ФМА инициирует «in vitro» начало ангиогенеза при воспалении артрита.
- **Стимуляция IL-1 β** - второй основной вид цитокинов, участвующих в физиопатологии ОА, способствует деградации хряща.

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% эмбриональной бычьей сыворотки, раствора антибиотика G-418 в концентрации 0,1 мг/мл, в стандартных условиях культивирования (37°C, 95% относительной влажности и 5 % CO₂) и собирали за 48 часов до начала обработки испытуемыми веществами.

Клетки собирают путем трипсинизации (Трипсин/ЭДТА 0,1 г% - Сигма).

Химические вещества и реактивы:

- Набор TaqMan® Array для определения пути IL6 человека; набор TaqMan® Array для определения IL8 человека; набор TaqMan® Array для определения IL1 человека (Thermo-Fischer Scientific)
- Тест-система BD Cytometric Bead Array (CBA) - комплект человеческих воспалительных цитокинов (BD Pharmingen) для одновременного обнаружения растворимых факторов: набор IL6 flex, набор IL8flex, набор l rEGF flex, набор буферного раствора протеина.

Оборудование:

- Проточный цитометр FACS CANTO II (Becton - Dickinson) с программным обеспечением DIVA 6.1 и FCS Express.
- Система ПЦР с детекцией в реальном времени модели Step One Plus (Applied Biosystems)

Методы:

А) Окрашивание провоспалительных цитокинов с помощью тест-системы BD Cytometric Bead Array (CBA) - BD™ Cytometric Bead Array (CBA) представляет собой приложение для проточной цитометрии, которое позволяет пользователям количественно определять несколько белков одновременно. Каждая захватывающая микросфера в наборе сопрягается с конкретным антителом. Реактив обнаружения, представленный в наборе, представляет собой смесь фикоэритрин (ФЭ) - конъюгированных антител, которая обеспечивает флуоресцентный сигнал пропорционально количеству связанного анализируемого вещества (в нашем конкретном случае IL6, IL8 и VEGF). Анализ результатов (стандартная кривая для каждого расчета цитокинов и концентрации) выполняется с помощью программного обеспечения FCAP Beads Array [15].

Б) Система ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР в реальном времени) применялась для проведения функционального анализа генов IL6, IL8 и IL1 β , используя специфические реактивы TaqMan. В этом типе реактива используется флуорогенный зонд, который накапливается во время циклов амплификации, причем интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству ампликонов, образующихся во время реакции ПЦР. Чем выше число копий последовательности ДНК, тем раньше определяется излучаемая флуоресценция. Для количественного анализа экспрессии гена-мишени (в данном конкретном случае IL6, IL8 и IL1 β) используется сравнительный метод St (AASt). Проводится сравнение амплификации гена-мишени с конститутивным геном (эндогенный

контроль, ген с неизменной экспрессией, с нормирующей ролью). Относительный количественный анализ (ОКА) выражает количество гена-мишени, нормализованного по отношению к конститутивному гену, для каждого проанализированного образца. Выход данных выражается как кратная разность уровней экспрессии по сравнению с необработанным образцом [16].

Результаты и обсуждение

Клетки CHON-001 инкубировали за 24 часа до обработки препаратом Алфлутоп® и дексаметазоном, соответственно. В качестве положительного контроля использовали Дексаметазон 200 нг/мл, который является эффективным противовоспалительным средством [17]. Учитывая условия стимуляции и воспалительный путь, наблюдаемый в каждый конкретном случае, мы исследовали влияние препарата Алфлутоп® на панель наиболее важных цитокинов, которые способствуют росту остеоартритных повреждений: IL6, IL8 и VEGF. IL6 является белком острой фазы, высвобождаемым при остеоартрите, который генерирует сигнальный каскад и, в конечном итоге, разрушает ткани сустава. IL8 представляет собой хемокин, который устанавливает хемотаксический поток к поверхности сустава и опосредует миграцию и прикрепление нейтрофилов и лимфоцитов к этой ткани. VEGF является аутокринным стимулятором хондроцитов, который опосредует в основном деструктивные процессы при остеоартрите.

IL1 β и TNF- α являются доминирующими цитокинами в воспалительном каскаде, которые способствуют деградации хряща путем усиления синтеза MMP и апоптоза хондроцитов, но действуют с некоторыми отличиями:

- TNF- α активирует NF- κ B и индуцирует апоптоз
- IL1 β вызывает продуцирование провоспалительных цитокинов, стимулирует продуцирование стромелизина и коллагеназы, а также дифференциацию остеокластов.

Предварительно проводились испытания соответствующего времени и дозы стимулов, и окончательная конфигурация является следующей:

Кол-во экспериментальных версий	Стимулы	Продолжительность стимуляции	Доза стимулов	Ответ на клетки линии CHON-001
1.	IL1 β	24 часа	10 нг/мл	Стимулирует высвобождение IL6; уровень IL8 во внеклеточной жидкости увеличивается; уровень VEGF остается неизменным.
2.	IL1 β	72 часа	10 нг/мл	Стимулирует высвобождение VEGF; уровни IL6 и IL8 во внеклеточной жидкости снижаются
3.	TNF- α	20 часа	20 нг/мл	Стимулирует высвобождение IL6 и IL8; уровень VEGF остается неизменным
4.	ФМА	24 часа	1 мкМ	Стимулирует высвобождение IL6, IL8 и VEGF

IL1 β индуцирует обратимую стимуляцию клеток CHON, особенно IL6. Через 24 часа стимуляции наблюдается более высокая внеклеточная концентрация IL6, а через 72 часа внутренние клеточные механизмы противодействуют действию IL1 β и даже уменьшают высвобождение IL6 и IL8. Количество VEGF можно измерить точно только через 72 часа стимуляции IL1 β .

Учитывая оптимальное сочетание параметров стимуляции, были проведены эксперименты и количественные оценки эффектов препарата Алфлутоп®. Результаты представлены на рисунках 1-3.

Препарат Алфлутоп® ингибирует внеклеточное высвобождение IL6, особенно на пути ФМА

и TNF- α , которые предотвращают или замедляют прогрессирование воспалительного каскада.

Внеклеточное высвобождение IL8 сильнее, когда ФМА стимулирует хондроциты, соединяющие два клеточных события: активацию активных форм кислорода и рекрутмент нейтрофилов в месте воспаления. Препарат Алфлутоп® противодействует этим клеточным событиям, ингибируя IL8-опосредованное воспаление.

Внеклеточное высвобождение IL6 в стимулированных хондроцитах

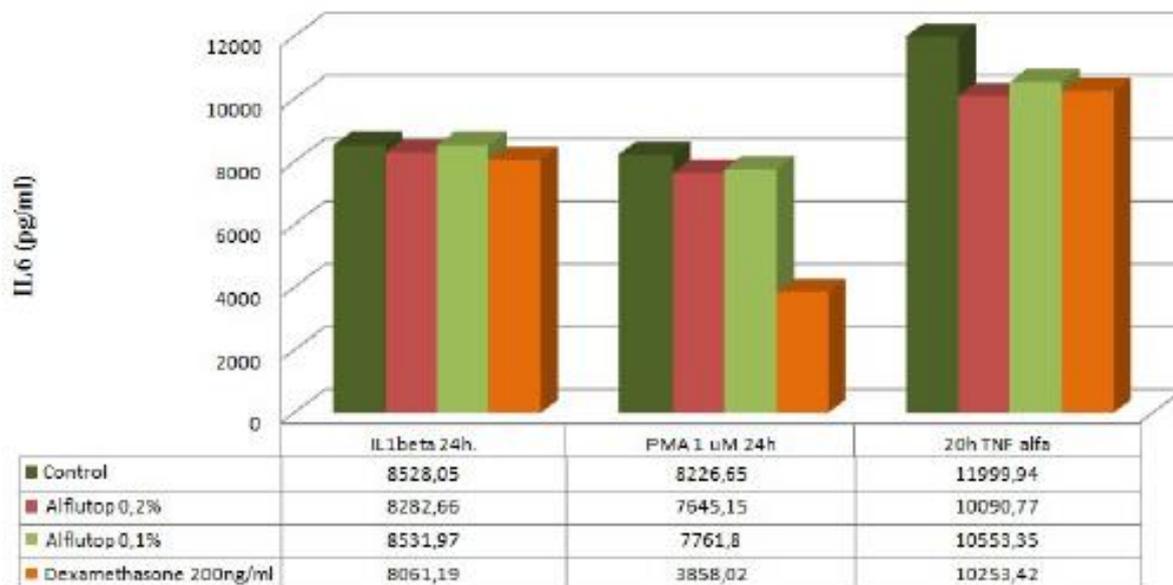


Рисунок 1. Эффекты препарата Алфлутоп® на внеклеточное высвобождение IL6 в провоспалительных стимулированных хондроцитах (линия клеток CHON-001)

Внеклеточное высвобождение IL8 в стимулированных хондроцитах



Рисунок 2. Эффекты препарата Алфлутоп® на внеклеточное высвобождение IL8 в провоспалительных стимулированных хондроцитах (линия клеток CHON-001)

Внеклеточное высвобождение VEGF в стимулированных хондроцитах

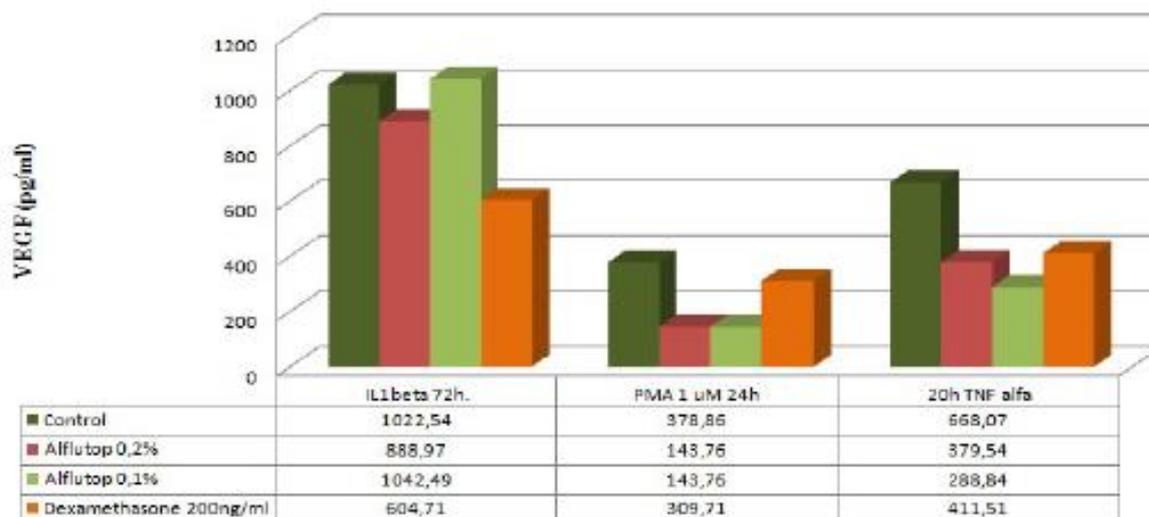


Рисунок 3. Эффекты препарата Алфлутоп® на внеклеточное высвобождение VEGF в провоспалительных стимулированных хондроцитах (линия клеток CHON-001)

Подписи на рисунках: Control = контроль; Alflutop 0.2% = Алфлутоп 0,2%; Alflutop 0.1% = Алфлутоп 0,1%; Dexamethasone 200 mg/ml = Дексаметазон 200 мг/мл.

Алфлутоп® значительно снижает уровень внеклеточного VEGF, что предполагает терапевтический эффект в VEGF-опосредованных деструктивных процессах (например, стимуляция MMP и деградация матричного белка). Дексаметазон, мощный противовоспалительный препарат, не имеет такого же сильного, как у препарата Алфлутоп®, взаимодействия в модуляции высвобождения VEGF, особенно на пути воспаления ФМА и TNF- α .

Для молекулярной модели противовоспалительного действия проводили анализ генов, кодирующих IL6, IL8 и IL1 α . В качестве репрезентативной характеристики для модели экспрессии генов были выбраны вышеуказанные цитокины, учитывая их сильное влияние на прогрессирование системного/остеоартрозного воспаления: **IL-6** играет комплексную роль в патогенезе остеоартрита посредством инициирования воспалительного процесса; **IL-8** является хемотаксическим фактором для цитокинов, индуцирующим хемотаксис первичных нейтрофилов и гранулоцитов, которые вызывают их миграцию в место воспаления; **IL1 β** участвует в инициировании и прогрессировании остеоартрита, начиная каскад внутриклеточных событий, которые определяют активацию протеиназ, создают про-деструктивные участки сустава, а также уменьшают синтез внеклеточного матрикса. GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) использовали в качестве эндогенного контрольного гена для экспрессии гена цитокинов. В качестве провоспалительного стимула TNF- α был выбран системный агент со значительными эффектами на фенотипическом уровне.

Экспрессия провоспалительных генов в основных условиях отсутствия стимуляции в сравнении с условиями при стимуляции TNF- α демонстрирует эффект избыточной экспрессии генов-мишеней (IL6, IL8 и IL1 α), сохраняя роль TNF- α в качестве триггера провоспалительного каскада.

На графике ниже представлена относительная количественная оценка экспрессии генов-мишеней в TNF- α -стимулированных клетках, которые обрабатывали двумя дозами препарата Алфлутоп®, по сравнению с необработанным контролем (отношение относительной количественной оценки (RQ) образца/контроля). (Рисунок 4)

RQ экспрессии гена (образец/контроль)

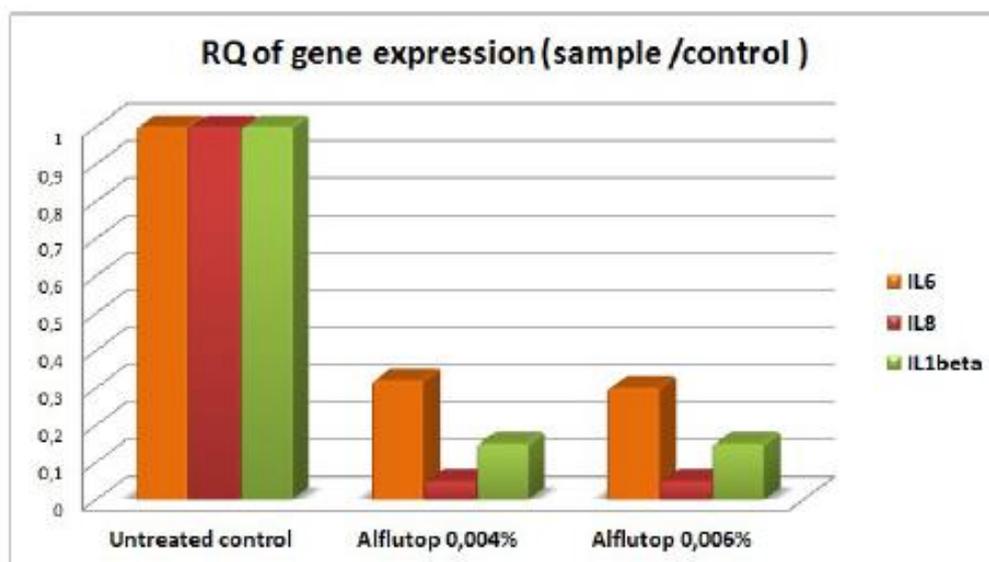


Рисунок 4. Эффекты препарата Алфлутоп® на гены IL6, IL8 и IL1 β с избыточной экспрессией в хондроцитах (линия клеток CHON-001), стимулированными провоспалительным стимулом TNF- α

Результаты подтверждают постоянное участие препарата Алфлутоп® в сигнальном пути провоспалительных цитокинов, начиная с контроля экспрессии генов (снижение регуляции генов IL6, IL8 и IL1 β).

Выводы

Алфлутоп® ингибирует высвобождение интерлейкинов IL6 и IL8, основных модуляторов прогрессирования острой фазы воспаления, оказывая значительное противовоспалительное действие на несколько классических путей. Комплексность действия биологически активных компонентов препарата Алфлутоп® конвергируется в направлении нескольких путей стимуляции, относящихся к спектру воспалительных факторов остеоартрита: TNF- α (первичный воспалительный агент с системным воздействием, который опосредует катаболический каскад и апоптоз клеток), ФМА (способствует воспалению, вызванному активными формами кислорода) и IL1 β (промотор активации деградирующих ферментов).

Препарат Алфлутоп® ингибирует VEGF, важный фактор ангиогенеза с недавним обнаруженным воздействием в качестве биохимического медиатора в деструктивных процессах при остеоартрите.

In vitro эффект препарата Алфлутоп® на некоторые внеклеточные сигнальные факторы,
участвующие в воспалении при остеоартрите

In vitro модификация этих важных медиаторов воспаления определяет действие препарата Алфлутоп® для восстановления физиологического здоровья хряща посредством анти-цитокинного действия.

Литература