

ИЗМЕНЕНИЕ IN VITRO МЕХАНИЗМОВ ОСТЕОАРТРИТА С ПОМОЩЬЮ ПРЕПАРАТА АЛФЛУТОП®

Лаура ОЛАРИУ^{1,2}, Бриндуса ДИМИТРИУ^{1,*}, Диана Мануэла ЭНЕ¹, Алексей ПАВЛОВ³, Наталия ПЯТИГОРСКАЯ³, Наталия РОСОИУ^{1,2}.

¹ S.C. Biotehnos S.A., 3-5 Gorunului Street, 075100-Otopeni, Ilfov, Румыния, Тел: +40317102402, Факс: +40317102400, электронная почта: lolariu@biotehnos.com

*Автор для отправки корреспонденции: Бриндуса ДИМИТРИУ, электронная почта: dbrandusa@biotehnos.com

² Академия румынских ученых, 54 Splaiul Independentei 050094, Bucharest, Румыния

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Аннотация. Повреждения при остеоартрите носят комплексный характер, и нейтрализуются по двум основным направлениям: индуцирование восстановительных и регенеративных эффектов на клетки и ядерный белок и/или посредством антиоксидантного и противовоспалительного эффекта. Препарат Алфлутоп® представляет собой стандартизированный раствор для инъекций на основе концентрата небольших рыб с показанием к применению при дегенеративных ревматических заболеваниях. Его фармакологическое действие основано на синергии действующих веществ, которые присутствуют в составе продукта. Цели этого исследования включают идентификацию клеток- и молекул-мишеней действия препарата Алфлутоп®, имеющих отношение к дегенеративным заболеваниям суставов. Наши результаты свидетельствуют о важном терапевтическом потенциале к повышению способности организма к восстановлению, восстановлению биомеханической устойчивости вязкоупругого матрикса хрящевой ткани, что приводит к хондропротекторному действию, восстановлению меж- и внутриклеточных сигнальных путей в хрящевом матриксе и, таким образом, повышению компрессионной прочности сустава и уменьшению воспаления.

Ключевые слова: Алфлутоп®, клеточная культура хондроцитов, остеоартрит, воспаление хрящевой ткани, хонрогенная терапия.

Введение

Дегенеративные заболевания суставов являются хроническими нарушениями, ухудшающими качество жизни, основной причиной которых являются совокупность локальных или системных факторов риска, оказывающих большое влияние на течение заболевания: повреждение сустава, выпрямление, метаболизм костей, ожирение и т. д. Достижения в области молекулярной биологии представляют остеоартрит как очень сложное многофакторное заболевание, характеризующееся «незначительным воспалением» хрящевой ткани и синовиальной мембраны, что приводит к нарушению структуры сустава и прогрессирующему ухудшению хряща. (1, 14).

Здоровая ткань представляет собой нормальный хрящ без каких-либо трещин, признаков синовиального воспаления. Остеоартрит характеризуется ранним локальным дегенеративным поражением и «фибриллированным» хрящом, а также ремоделированием кости, что приводит к костному выросту и субхондральному склерозу при эпизодическом воспалении синовиальной оболочки, изношенных сухожилий. (2)

Деградация хряща может иметь несколько патологических соответствий, основными из которых являются: артроз, остеоартрит, ревматоидный артрит. Все они являются прогрессирующими дегенеративными заболеваниями с воспалительным компонентом на уровне синовиальной мембраны и характеризуются деградацией хряща, образованием остеофитов, но сопровождаются различной интенсивностью воспалительных компонентов. При дегенеративных заболеваниях суставов появляются клеточные и молекулярные модификации, например деградированный внеклеточный матрикс, фрагментированная сеть протеогликанов, пре-сенесцентный хондроцит. Суставные хондроциты проявляют дозозависимый ответ на напряжение сдвига, что приводит к высвобождению цитокинов, экспрессии металлопротеиназы матрикса и активации внутриклеточных сигнальных путей. Выделение растворимых медиаторов и макромолекул внеклеточного матрикса в ответ на механическую стимуляцию способствует поддержанию гомеостаза хрящевой ткани сустава *in vivo*. (3).

Остеоартритные хондроциты за пределами клетки постоянно стимулируются аутокринными и паракринными факторами, синовиальными стимулами и фрагментами белка из деградированной матрицы, вызывающей множественные клеточные реакции при анаболизме, катаболизме и фенотипических уровнях. Число хондроцитов уменьшается вследствие нарушений пролиферации и апоптоза. Клетки отмирают, теряя большую часть своих функций. ОА представляет несколько провоспалительных внеклеточных факторов передачи сигнала, таких как провоспалительные цитокины (IL6, IL8, IL1b), металлопротеиназа матрикса (коллагеназы), агреканы, гиалуронидаза, факторы роста (TGFb), нейронные медиаторы. Помимо этого, свободные радикалы (ROS) вместе с аутоиммунными факторами ускоряют прогрессирование этого заболевания.

Стратегии подходов в лечении должны учитывать биохимическую сложность внутриклеточных/межклеточных взаимодействий, направленных на ключевые факторы, являющиеся конечной целью лечения причин заболевания, а не его эффекта. Для полного скрининга «*in vitro*» мы должны рассмотреть все возможные цели основных патологий (Рисунок 1).

Экспериментальные исследования, проведенные с момента первой разработки этого препарата, позволяют идентифицировать молекулы-мишени для препарата Алфлутоп®, а также оптимальную активную конфигурацию. В настоящем документе будет представлен обновленный обзор основных исследованных эффектов «*in vitro*».

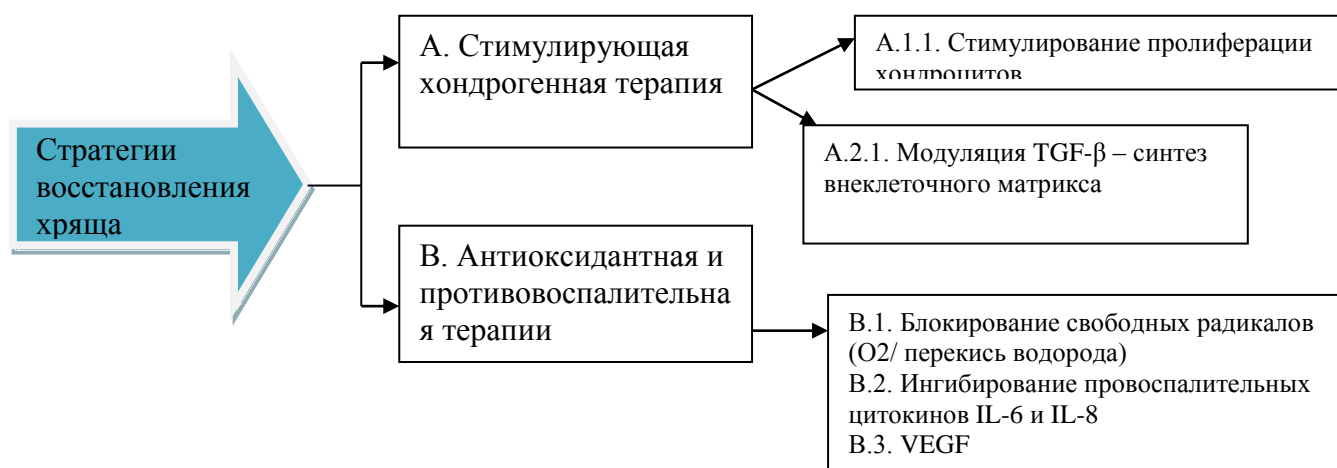


Рисунок 1. Терапевтические цели лечения остеоартрита, изучаемые при разработке препарата Алфлутоп (in vitro скрининг).

Материалы и методы

Культуры клеток:

CHON-001 - (ATCC® CRL-2846™) - нормальные хондроциты человека из длинной хрящевой кости представляют *преимущества стандартизированной и возобновляемой клеточной модели*.

Культивирование: модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы, 10%-ая фетальная бычья сыворотка, раствор антибиотика G-418 в концентрации 0,1 мг/мл, инкубатор при температуре 37°C, 95% относительной влажности и 5 % CO₂.

Хондроциты, выделенные из хряща кролика (первичная культура) – преимущества сохранения физиологических характеристик первичного источника – хряща. Хондроциты были выделены из фрагментов хряща, иссеченных из длинных костей 2-летних самцов кроликов путем ферментативного переваривания с помощью коллагеназы II.

Культивирование: DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10%-ая фетальная бычья сыворотки и раствор антибактериальных и антимикотических агентов при температуре 37°C, влажности воздуха 95% и 5% CO₂.

Их использовали в пределах двух первых пассажей.

Методы in vitro для проверки биологического действия препарата Алфлутоп®:

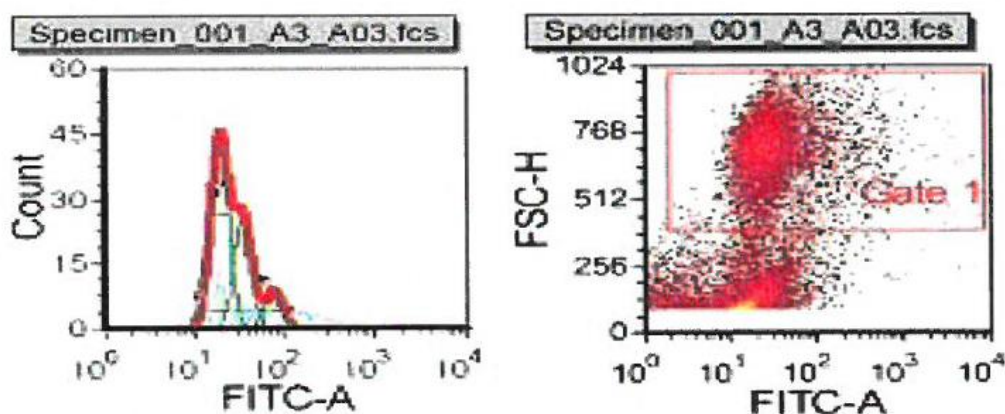
КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК путем обнаружения методом проточной цитометрии:

Клеточный цикл: - специфическая маркировка ДНК с помощью флуоресцентного красителя пропидиума иодида (PI). (реактив Cycle Test Plus DNA - BD Pharmingen)

Последовательная пролиферация поколений клеток (набор Cell Trace CFSE Cell Proliferation - Invitrogen): - метод 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. При делении клеток краситель равномерно распределяется между дочерними клетками, что обеспечивает разрешение для почти восьми циклов клеточного деления во время проточной цитометрии (Рисунок 2).

Растворимые ключевые белки из внеклеточной среды (VEGF, TGF-β, провоспалительные

цитокины: IL6, IL8), количественно определяемые посредством проточной цитометрии - BD™ Cytometric Bead Array (CBA) - BD Pharmingen - Реактив обнаружения, входящий в состав набора, представляет собой смесь фикоэритрина (ФЭ)-конъюгированных антител, которые обеспечивают флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству связанного белка. 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). Анализ полученных результатов (стандартная кривая для цитокинов и расчет концентрации) выполняют с помощью программного обеспечения FCAP Beads Array.



Поколение	Поколение #	Логарифм. стандартное отклонение	Кол-во клеток	% оригинальных клеток
Не деленные клетки	0,00	35,73	502,00	10,32
Поколение 1	1,00	35,73	1501,00	32,09
Поколение 2	2,00	0,00	0,00	0,00
Поколение 3	3,00	35,73	2756,00	56,66

Индекса деления	Индекс пролиферации	% деления	Кол-во оригинальных клеток	Погрешность среднеквадратичной величины	R – хи квадрат
3,84	2,96	69,15	1627,00	2,95	10,95

Рисунок 2: Экспериментальные данные модели клеточной пролиферации для проточной цитометрии (анализ данных с помощью программного обеспечения FACS Express)

ИНГИБИРОВАНИЕ ГИАЛУРОНИДАЗЫ для оценки поддержки внеклеточного матрикса.

Измерение скорости реакции гиалуронидазы основано на методе Райссинга, который определяет концентрацию восстанавливающих концов р-N-ацетил-D-глюкозамина, образующихся при гидролизе гиалуроновой кислоты. В качестве стандарта использовали N-ацетил-D-глюкозамин. Для оценки количества N-ацетил-D-глюкозамина, образующегося вследствие активности гиалуронидазы, необходимо построить калибровочные кривые, которые коррелируют с количеством N-ацетил-D-глюкозамина с поглощением зондов при 585 нм (значение волны, где соединение, образованное N-ацетил-D-глюкозаминами и 4-диметиламинобензальдегидом, имеет максимум поглощения). Процедура проведения эксперимента с использованием DМАВ подробно описана в нашей предыдущей статье (4).

МОДУЛЯЦИЯ ОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА - оценка внутриклеточной КАТАЛАЗЫ (CAT) и СУПЕРОКСИД-ДИСМУТАЗА (SOD)

Для оценки ферментной активности CAT и SOD после отсоединения адгезивных клеток с помощью трипсина/ЭДТА, клетки однократно промывали холодным PBS и суспендировали в 300 мкл раствора лизиса клеток на $1 - 5 \times 10^6$ клеток. Суспензию переносили в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 12000-14000 x г при температуре 2-8°C. Надосадочная жидкость содержала экстрагированную клеточную каталазу и супероксид-дисмутазу. Супероксид-дисмутазу (SOD) представляет собой металлофермент, который катализирует дисмутацию супероксидного аниона в кислород и перекись водорода. Мы использовали спектрометрические процедуры, описанные компанией «Sigma Aldrich» для определения активности SOD в образцах (5). Метод основан на спектрофотометрической оценке (спектры поглощения 550 нм) скорости ингибирования восстановления цитохрома C, конкурируя с супероксид-дисмутазой за супероксидный радикал. Каталазу (CAT) анализировали в соответствии со способом Aebi (6). Оценку проводили спектрофотометрически, измеряя уменьшение оптической плотности при длине волны 240 нм. Реакционная смесь содержала 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,0), 2 мМ H₂O₂ и клеточные лизаты. Специфическая активность каталазы выражается в единицах/мг белка. Единица определяется как константа скорости в секунду.

МОДУЛЯЦИЯ ОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА - проточная цитометрия для активных форм кислорода - ROS - количественная оценка - DCFH-DA (для ВОДОРОДА)

Окислительный стресс клеток посредством внутриклеточной активации аниона супероксида и перекиси водорода количественно определяется путем одновременного измерения внутриклеточных уровней H₂O₂ и O₂ – окрашивание DCFH-DA (дихлорфлуоресцеинового диацетата) и окрашивания ГЭ (гидроксиэтидием) и анализа методом проточной цитометрии. DCFH-DA встраивается в липидно-гидрофобную область мембраны, где гидролитические ферменты откладывают остатки диацетату, высвобождая конфигурацию мембранной проницаемости, которая окисляется в цитоплазме межклеточной перекисью водорода, обеспечивая флуоресценцию FITC-A (излучение 530 нм). ГЭ проникает в клеточную мембрану и окисляется супероксидным анионом этидия бромидом, который плотно связывает ДНК и выделяется при 620 нм (PE-A). Количество перекиси водорода и супероксида пропорциональны изменению среднего канала флуоресценции: среднее значение FITC-A - для пероксида водорода и среднее значение PE-A - для супероксидного аниона. Диаграммы проточной цитометрии демонстрируют клеточную субпопуляцию (зеленый и синий), производящую перекись водорода (положительный FITC-A) и супероксидный анион (положительный PE-A) – рисунок 3.

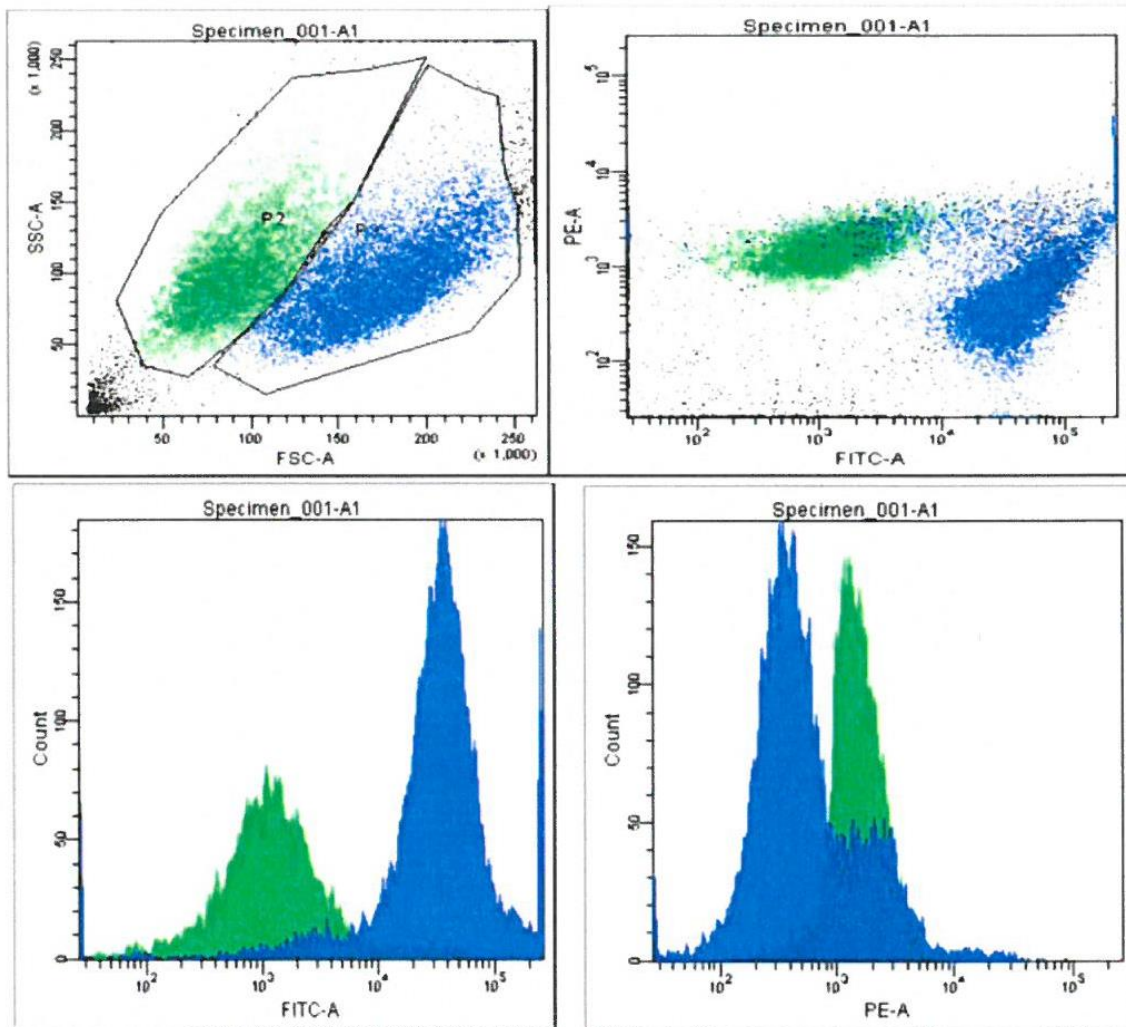


Рисунок 3. Диаграммы проточной цитометрии, демонстрирующие межклеточные уровни H_2O_2 и O_2 .

Модели стимуляции клеток: $IL1\beta$ и $TNF-\alpha$, доминанты цитокинов в воспалительном каскаде, но действуют с несколькими отличиями:

- $TNF\alpha$ - первичный воспалительный агент с системным воздействием, активирует NF- κ p и индуцирует апоптоз
- $IL1\beta$ запускает производство провоспалительных цитокинов, стимулирует образование стромелизина и коллагеназы, а также дифференциацию остеокластов.

Положительный контроль:

- Аскорбиновую кислоту использовали в качестве мощного антиоксидантного контроля, а также положительного контроля пролиферации хондроцитов;
- Глицирризиновую кислоту (Gly) использовали в качестве мощного контроля ингибирования гиалуронидазы;
- N-ацетилцистеин использовали в качестве мощного антиоксиданта;
- Эйкозапентаеновая кислота (EPA) используется в качестве антиоксидантного контроля;
- Дексаметазон - это хорошо зарекомендовавший себя противовоспалительный агент.

Результаты и обсуждение

Модели *in vitro* для проверки биологического действия препарата Алфлутоп® выбирали с учетом соответствующего полного скрининга основных путей остеоартрита, как описано на Рис. 1.

А. Стимулирующая хондрогенная терапия (согласно Рисунка 1)

А.1.1. Клеточный компонент – усиление пролиферативного статуса

Модели реакции хондроцитов при остеоартрите можно обобщить в пяти категориях: пролиферация и гибель клеток (апоптоз); изменения в синтетической активности и деградации; фенотипическая модуляция суставных хондроцитов; и образование остеоцитов. (7) Хондроциты выступают в качестве основного действующего лица для поддержания, организации и составления хрящевого матрикса. Кроме того, процент хондроцитов является низким (1-5% от общего объема хряща), и они имеют медленную скорость размножения, поэтому их стимулирование является чрезвычайно важной целью для лекарственного средства. (8)

Наши предыдущие исследования показывают, что Алфлутоп® значительно увеличивает % клеток в фазе репликации (S) и в фазе митоза (G2/M) клеточного цикла. Кроме того, Алфлутоп® значительно увеличивает индекс пролиферации хондробластов CHON 001 и первичных хондроцитов кролика (9).

А.2.1. Обеспечение внеклеточного матрикса посредством модуляции TGFβ

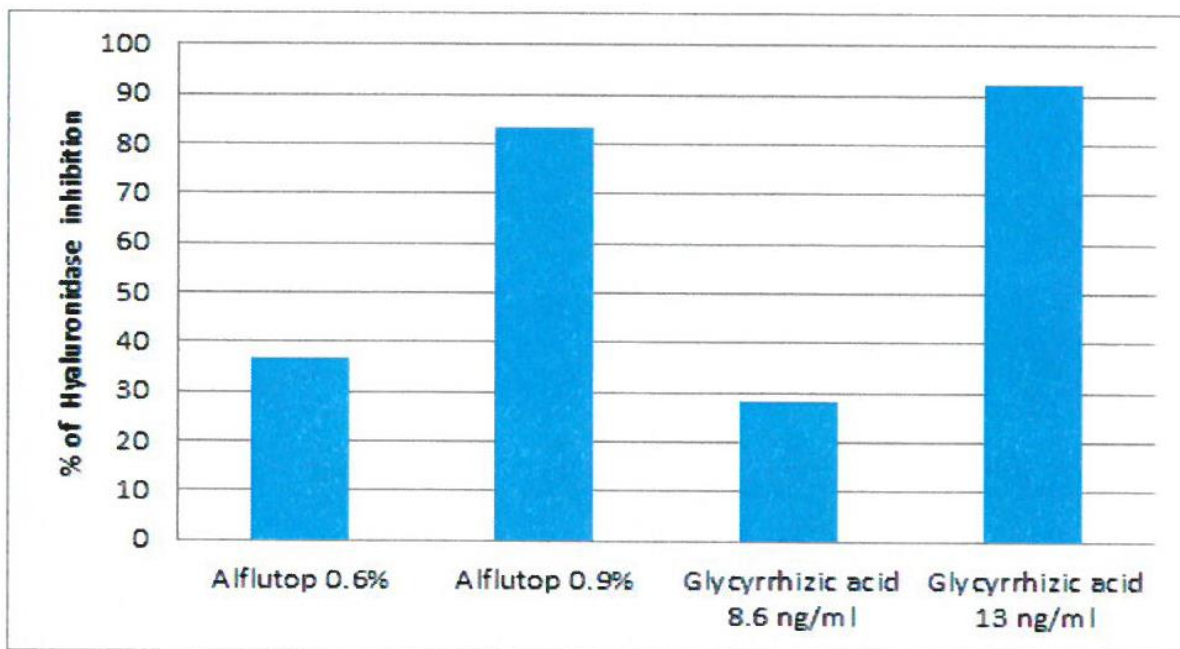
Трансформирующий фактор роста бета (TGF-бета) является повсеместно распространенным регулятором клеточного роста и дифференцировки. TGF-бета существенно стимулирует синтез ДНК в зависимости от дозы, демонстрируя увеличение митогенности при увеличении созревания клеток с максимальной стимуляцией в пролиферирующих и ранних гипертрофических клетках, что указывает на потенциально важную аутокринную функцию для TGF-бета при модулировании пролиферации хондроцитов и синтеза матрикса при эндохондральной кальцификации (10). Когда TGF-бета связывается с хондроцитами, инициируются сигнальные каскады рецепторов клеточной поверхности, среди которых наиболее важным является путь TGF-β-Smad. TGF-бета также активирует протеинкиназы, включая MAPK, PKA и PKC, а также модулирует экспрессию гена посредством его тонкого взаимодействия с другими сигнальными путями. Улучшение исследования механизмов, лежащих в основе сигнальных путей, опосредованных TGF-бета, и их эффектов может значительно повлиять на лечение многих распространенных ортопедических заболеваний (11).

Предыдущие опубликованные данные (9) показали значительную активацию TGF-β, равную 7%, которую индуцирует препарат Алфлутоп® в сравнении с клеточным контролем. Такую активацию TGF-β следует рассматривать в отношении общего гомеостаза клетки, учитывая, что TGF-β регулирует тонкий баланс синтеза/ деградации белка, а высокий пул этого сигнального белка может привести к аномальной оссификации.

А.2.2. Поддержка внеклеточного матрикса посредством ингибирования гиалуронидазы

Внутриклеточный матрикс представляет собой сложный гель, содержащий воду, электролиты, метаболиты, витамины, ферменты, углеводы, липиды и белки. Вязкость этого матричного раствора обусловлена большим количеством макромолекул: кислотных мукополисахаридов с длинной цепью, усиленной на микроскопическом уровне с помощью трехмерной сети коллагеновых волокон. Важной особенностью внутриклеточных веществ является их очень высокая вязкость и сцепление. Эта особенность зависит от химической целостности больших молекул. Гиалуронан с высокой молекулярной массой, гиалуроновая кислота (ГК) встречается в нормальных тканях и обладает антиангиогенными, противовоспалительными и антииммуногенными свойствами. Фрагментированная ГК, напротив, обладает сильным ангиогенным, сильным воспалительным и иммуностимулирующим свойством, отражая состояние тканей в состоянии стресса (12). Основной функцией ГК с высокой молекулярной массой в синовиальном суставе является поддержание надлежащей вязкоупругости синовиальной жидкости. Благодаря этому свойству ГК служит в качестве амортизатора, а также обеспечивает плавность движения суставов. Вязкость может уменьшаться, а структурная целостность разрушаться деполимеризирующим действием фермента, называемого гиалуронидазой. В дегенеративных процессах гиалуроновая кислота интенсивно деполимеризуется гиалуронидазой, основным веществом матрикса разрушающихся соединительных

и хрящевых тканей. Из-за уменьшения размеров молекул вязкость гиалуроновой кислоты снижается. (13, 16). Поскольку развитие многих заболеваний может быть связано с действием этого фермента, в настоящее время многие фармацевтические исследования сосредоточены на изучении специфических ингибиторов и потенциала гиалуронидазы. (15) Ферментативная активность гиалуронидазы определялась в присутствии препарата Алфлутоп и глицирризиновой кислоты, а результаты представлены на Рисунке 4.



Надписи на рисунке: по вертикали - % ингибирования гиалуронидазы, по горизонтали – Алфлутоп 0,6%, Алфлутоп 0,9%, Глицирризиновая кислота в концентрации 8,6 нг/мл, Глицирризиновая кислота в концентрации 13 нг/мл

Рисунок 4. Ферментативная активность гиалуронидазы в присутствии препарата Алфлутоп и глицирризиновой кислоты

Алфлутоп® демонстрирует ингибирование активности гиалуронидазы в зависимости от дозы, аналогично положительному контролю, глицирризиновой кислоты.

В. Антиоксидантные и противовоспалительные эффекты (согласно Рисунку 1)

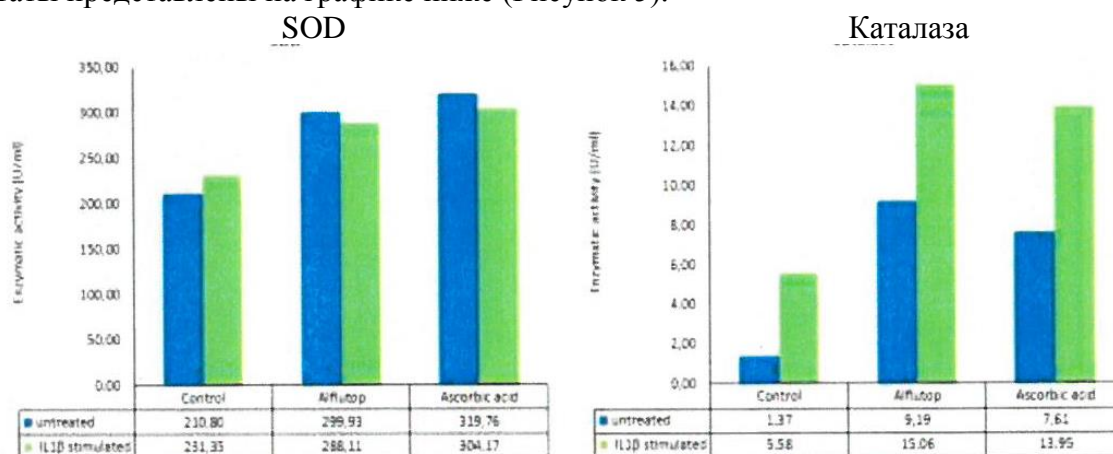
В.1. Модуляция оксидантного баланса

Активные формы кислорода (ROS) могут способствовать возникновению и прогрессированию дегенеративных патологий, относящихся к артриту, вызывая неизбежную гибель хондроцитов и деградацию матрикса. Однако ROS также являются ключевыми компонентами многих нормальных физиологических процессов, и в умеренных количествах они выступают в качестве незаменимых вторичных мессенджеров (16). В качестве первого этапа антиоксидантного/антирадикального скрининга определяли активность клеточной каталазы (CAT) и супероксид-дисмутазы (SOD), которую коррелировали с дальнейшим внутриклеточным контролем перекиси водорода и супероксидного аниона методом проточной цитометрии.

В.1.1. Количественное определение каталазы и супероксид-дисмутазы в культуре первичных хондроцитов кролика

После 48-часовой обработки первичных хондроцитов кролика независимо от стимуляции IL1 β клетки лизировали и оценивали ферментативную активность из лизата методом 1) косвенного измерения самоокисления кверцетина, линейно коррелированного с активностью SOD, и 2) деградации перекиси водорода в качестве непосредственного определения активности каталазы.

Результаты представлены на графике ниже (Рисунок 5).



Надписи на рисунке: по вертикали – ферментативная активность (Ед/мл), по горизонтали – control = контроль, Alflutop = Алфлутоп, Ascorbic acid = аскорбиновая кислота. Untreated = необработанные; IL1β stimulated = стимулированные IL1β.

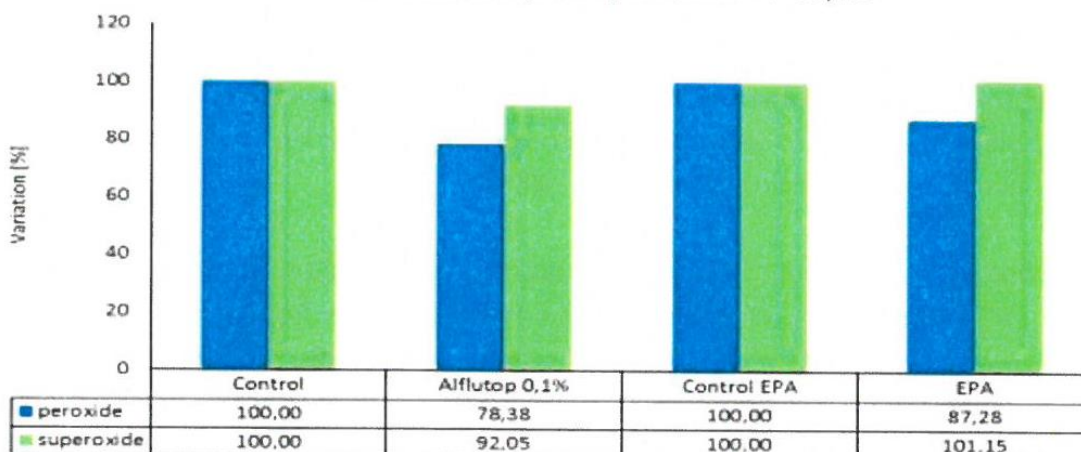
Рисунок 5: Модуляция активности внутриклеточной супероксид-дисмутазы (SOD) и каталазы с помощью препарата Алфлутоп® и аскорбиновой кислоты в качестве положительного контроля.

Обработка первичных хондроцитов кроликов препаратом Алфлутоп® стимулирует активность SOD и каталазы как в условиях отсутствия стимуляции, так и при провоспалительных деструктивных повреждениях, имитируемых стимуляцией IL1β. Повышение каталитической активности этих антиоксидантных ферментов, индуцированных препаратом Алфлутоп®, приводит к защитному действию против окислительного стресса, трансформации супероксидного аниона и перекиси кислорода, агрессивных активных форм кислорода.

В.1.2. Оценка антиоксидантной активности посредством мониторинга внутриклеточных активных форм кислорода из культуры первичных хондроцитов кроликов

Стимуляция IL1β генерирует окислительное стресс клетки, выраженный на уровне ROS, путем среднего повышения флуоресценции перекиси водорода (143% по сравнению с нестимулированным контролем) и супероксидного аниона только на 13%. Поэтому массовое выделение перекиси водорода является характерным для специфической стимуляции, и, в конечном счете, приводит к генерализованным повреждениям суставной ткани. В этих особых условиях препарат Алфлутоп® снижает содержание перекиси водорода на 33% по сравнению со стимулированным контролем, и аналогично положительному контролю, на 30% для омега-3 жирных кислот (эйкозапентаеновая кислота - EPA 10 мкМ). Содержание внутриклеточного супероксидного аниона снижается на 21% под действием препарата Алфлутоп® и на 20% под действием EPA 10 мкМ. (Рисунок 6). Стимуляция IL1β генерирует окислительное стресс клетки, выраженный на уровне ROS, путем среднего повышения флуоресценции перекиси водорода (143% по сравнению с нестимулированным контролем) и супероксидного аниона только на 13%. Поэтому массовое выделение перекиси водорода является характерным для специфической стимуляции, и в конечном счете приводит к генерализованным повреждениям суставной ткани. В этих особых условиях препарат Алфлутоп® снижает содержание перекиси водорода на 33% по сравнению со стимулированным контролем, и аналогично положительному контролю, на 30% для омега-3 жирных кислот (эйкозапентаеновая кислота - EPA 10 мкМ). Содержание внутриклеточного супероксидного аниона снижается на 21% под действием препарата Алфлутоп® и на 20% под действием EPA 10 мкМ. (Рисунок 6).

Вариации внутриклеточных активных форм кислорода (пероксид и супероксид) в стимулированных первичных хондроцитах кролика



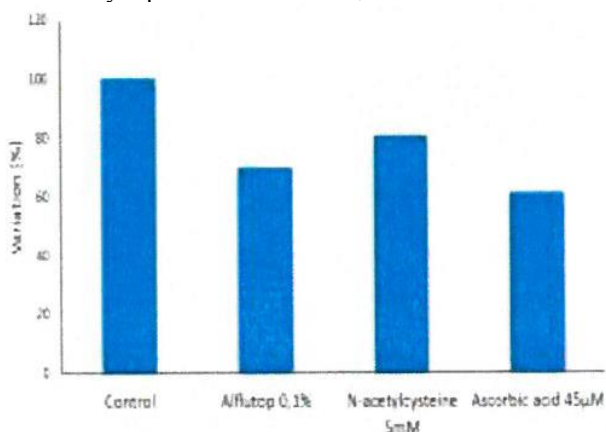
Надписи на рисунке: по вертикали – вариации (%), по горизонтали – control = контроль, Alflutop 0,1% = Алфлутоп 0,1%, Control EPA = контроль EPA, peroxide = пероксид; superoxide = супероксид.

Рисунок 6. Развитие ROS (перекись водорода и супероксидный анион) в первичных хондроцита кролика, стимулированных $IL1\beta$ и обработанных препаратом Алфлутоп® и EPA.

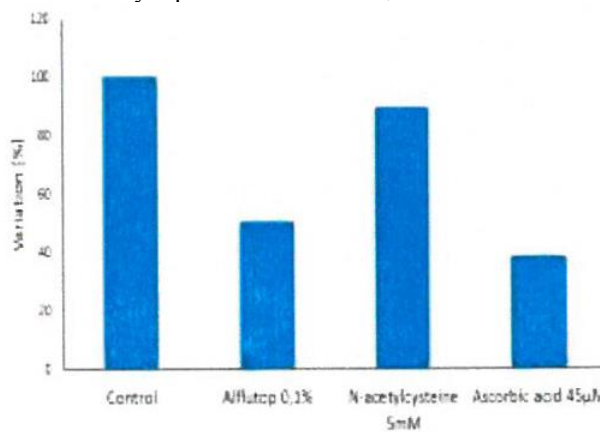
В.1.3. Оценка антиоксидантной активности посредством обнаружения активных форм кислорода внутри клетки нормальных человеческих хондроцитов - стандартизованной клеточной линии CHON-001

Хондроциты человека из стандартизованной клеточной линии CHON-001 стимулировали в течение 24 часов с помощью $TNF-\alpha$ в концентрации 15 нг/мл и ФМА в концентрации 0,1 мкМ; индуцированный окислительный стресс оценивали посредством увеличения флуоресценции до 38% для перекиси водорода и 61% для супероксидного аниона. Действие препарата Алфлутоп® сравнивали с N- ацетилцистеином в концентрации 5 мМ и аскорбиновой кислотой в концентрации 45 мкМ, двумя хорошо известными антиоксидантами. Результаты представлены на рисунке 6 как процент вариаций конкретного канала флуоресценции (H_2O_2 - FITC-A; O_2^- - PE-A) по сравнению со стимулированным контролем.

Вариации супероксида в хондроцитах линии CHON, стимулированных с помощью $TNF-\alpha$ + ФМА



Вариации пероксида в хондроцитах линии CHON, стимулированных с помощью $TNF-\alpha$ + ФМА



Надписи на рисунке: по вертикали – вариации (%), по горизонтали – control = контроль, Alflutop 0,1% = Алфлутоп 0,1%, N-Acetil-Cysteine 5 mМ = N- ацетилцистеином в концентрации 5 мМ, Ascorbic acid 45µМ = аскорбиновая кислота в концентрации 45 мкМ.

Рисунок 7: Эволюция ROS (перекись водорода и супероксидный анион) в хондроцитах человека - CHON-001, стимулированных с помощью TNF- α + ФМА и обработанных препаратом Алфлутоп®[®], аскорбиновой кислотой и N-ацетил-цистеином

Алфлутоп®[®] индуцирует ингибирование обоих активных форм кислорода, что является важным шагом при ROS-опосредованных нарушениях. Уровень внутриклеточной перекиси водорода снижается в присутствии препарата Алфлутоп®[®] на 50% по сравнению со стимулированным контролем, другие положительные эффекты контроля составляют 11% для N-ацетил-цистеина и 62% для аскорбиновой кислоты, соответственно. Действие на внутриклеточный супероксидный анион ниже, препарат Алфлутоп®[®] снижает его содержание на 31%, N-ацетил-цистеин на 20% и аскорбиновая кислота на 39% (Рисунок 7).

Выводы относительно антиоксидантной активности препарата Алфлутоп®:

При остеоартрите резко стимулируется продуцирование супероксидного аниона и перекиси водорода, вызывая выраженную экспрессию активных форм кислорода (ROS) в сочетании с ростом провоспалительных цитокинов и протеазной активности. SOD улучшает патологические явления при остеоартрите. Каталазная ассоциация усиливает защитный эффект как за счет более быстрого устранения перекиси водорода, так и для блокирования ее распада. Повышение SOD в присутствии препарата Алфлутоп®[®] индуцирует ингибирование окислительного стресса с импликацией супероксидного аниона, учитывая его роль в цепи активации агрессивных соединений цепи окислительного стресса. Рост SOD подтверждает ингибирование накопления супероксидного аниона, и экспериментальные данные подтверждают посредством дополнительных методов влияние препарата на эти антиоксидантные механизмы. Можно отметить импликацию препарата Алфлутоп®[®], особенно в системе ферментативных изменений внутриклеточной перекиси водорода, нейтрализующую продуцирование H₂O₂. Это один из самых агрессивных форм кислорода, который ингибирует SOD и продуцирует накопление супероксидных анионов, инициирует пути, которые сходятся, приводя к перекисидации липидов и к повреждениям и гибели клеток, блокируют глутано-пероксидазу, останавливая, таким образом, синтез глутации как внутреннего антиоксиданта. Уменьшая внутриклеточную H₂O₂, препарат Алфлутоп®[®] предупреждает усиление всех этих процессов. Будучи активатором SOD и каталазы, Алфлутоп®[®] уменьшает высвобождение медиаторов воспаления в потоке их распространения.

В.2. Модуляция провоспалительных цитокинов

Остеоартрит хрящевой ткани обусловлен как механическими, так и воспалительными сигналами. Специфические пути передачи сигнала, связанные с измененными физиологическими состояниями, которые приводят к усилению пролиферации или дифференцированию суставных хондроцитов, связаны с ненадлежащей активацией передачи сигналов NF- κ B. Воспаление и стресс-индуцированные реакции, организованные канонической сигнализацией NF- κ B, могут оказывать прямое и косвенное воздействие на возникновение и/или прогрессирование ОА. (16). Различные молекулярные аспекты, связанные с патогенезом остеоартрита, контролируются медиаторами воспаления, их каскадная сигнализация еще больше способствует катаболическому состоянию, апоптозу хондроцитов и результирующей прогрессирующей дегенерации суставного хряща (17). Цитокины, продуцируемые воспалительными клетками, индуцируют синовиальное воспаление и разрушение суставов при ревматоидном артрите (18,19). Провоспалительные цитокины способны индуцировать апоптоз, тогда как IL-4 в качестве противовоспалительного цитокина может ингибировать действие IL-1 α и TNF- α на выработку NO и пролиферацию хондроцитов (20). Катаболизм хряща, пораженного остеоартритом, включает в себя действие провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 1 (IL-1) и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α). Интерлейкин-1 снижает синтез внеклеточного матрикса (ВКМ) и улучшает синтез металлопротеазы за счет продуцирования оксида азота (NO) в хондроцитах. Синовиоциты человека спонтанно высвобождают IL-6 в степени, которая увеличивается с помощью IL-1 и TNF- α . Уровни интерлейкина-6

коррелируют с болью в височно-нижнечелюстном суставе, IL-6 в комбинации с IL-1 способствует деградации коллагена в хряще (21).

Алфлутоп уменьшает, в частности, высвобождение IL6 в человеческих хондроцитах, стимулированных с помощью IL1 β , что предупреждает или замедляет прогрессирование воспалительного каскада. Когда человеческие хондроциты стимулируются с помощью TNF- α , Алфлутоп ингибирует высвобождение интерлейкинов IL6 и IL8, основных модуляторов прогрессирования острой фазы воспаления, оказывая значительное противовоспалительное действие на эти классические пути. «*In vitro*» модуляция этих важных медиаторов воспаления подтверждает действие Алфлутоп® для восстановления физиологии хряща посредством действия антицитокинов (22).

В.3. Регуляция VEGF

Ангиогенез - это еще одно событие воспаления синовиальной ткани. Он начинается на ранних стадиях заболевания и может протекать бессимптомно. При этом IL8, VEGF или FGF β , действуют как проангиогенные маркеры. Все большее число наблюдений указывает на то, что VEGF, который долгое время считался эндотелий-специфичным на основе локализации его рецепторов, может вместо этого оказывать влияние также на типы не эндотелиальных 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. Экспрессия VEGF аутокринно активирует хондроциты для продуцирования MMP-1, -3 и -13. Количество TIMP-1 и -2, ингибиторов MMP, уменьшается посредством механической перегрузки. Увеличение MMP и уменьшение TIMP способствуют разрушению суставного хряща (24).

АЛФЛУТОП® ингибирует VEGF, важный фактор ангиогенеза, который согласно последним данным воздействует как биохимический медиатор в деструктивных процессах остеоартрита (ранее опубликованные результаты) (23).

В дополнение ко всем этим эффектам препарата Алфлутоп® следует также отметить: ингибирование экспрессии протеаз, ответственных за каскад деградации ядерного белка агрекана (экспрессия мРНК ADAMTS-4); увеличение синтеза агрекана и гиалуронана (активация экспрессии мРНК гиалуронан-синтазы - HAS-1); а также активацию основного регулятора транскрипции, необходимого для образования суставного хряща и гипертрофического созревания, SOX 9 (24) для предотвращения гипертрофии и увядания внеклеточного матрикса (24).

Выводы

Обзор молекулярных и клеточных эффектов в *in vitro* исследованиях для определения механизмов действия препарата Алфлутоп®:

Этот продукт, благодаря своему комплексу дополнительных биологических компонентов, демонстрирует интегрированный алгоритм действия *in vitro*, специфичного для остеоартрита. Продукт влияет на механизмы, которые восстанавливают и конфигурируют структурный матрикс на уровне хряща, позволяя восстановить функциональные пути.

- Алфлутоп® уменьшает/останавливает разрушение хряща, ингибируя экспрессию протеаз, ответственных за каскад деградации ядерного белка агрекана, улучшая клеточный ответ в катаболических процессах за счет увеличения синтеза агрекана и гиалуронана, и в то же время, ингибируя действие гиалуронидазы;
- Алфлутоп® помогает восстановить структурную целостность хряща, стимулируя пролиферацию хондроцитов;
- Алфлутоп® восстанавливает обновление клеток и поддерживает ядерный белок, стимулируя синтез ДНК в хондроцитах и умеренную стимуляцию TGF β , молекулы, ответственной за динамику истощения/восстановления баланса между синтезом и деградацией матрикса.

- Действие препарата Алфлутоп® различно: он уменьшает процесс воспаления, а также уменьшает окислительный стресс, обладает антиоксидантным эффектом, который проявляется в удалении свободных радикалов и индуцировании активации ферментов, участвующих в окислительных каскадах.

Все эти эффекты позволяют препарату Алфлутоп® ингибировать физиологическую дегенерацию, модулированную внутренними и внешними факторами, а также индивидуальную изменчивость. Доклиническое *in vitro* действие препарата Алфлутоп® является синергизмом, подтвержденным с помощью конвергентных клеточных механизмов.

Литература:

1. Musumeci G., Aiello F.C., Szychlinska M.A., Di Rosa M., Castrogiovanni P., Mobasheri A., (2015) Osteoarthritis in the XXIst Century: Risk Factors and Behaviours that Influence Disease Onset and Progression, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, pp 6093-6112
2. Felson D.T., Lawrence R.C., Dieppe P.A., Hirsch R., Helmick C.G., Jordan J.M., Kington R.S., Lane N.E., Nevitt M.C., Zhang Y., Sowers M., McAlindon T., Spector T.D., Poole A.R., Yanovski S.Z., Ateshian G., Sharma L., Buckwalter J.A., Brandt K.D., Fries J.F., (2000) Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors, *Ann Intern Med.*; **133**, pp. 635- 46
3. Lane S.R., Trindade M.C., Ikenoue T., Mohtai M., Das P., Carter D.R., Goodman S.B., Schurman D.J., (2000), Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology*, **37**(1-2), pp. 95-107
4. Craciun M.L., Vacaru A.M., Ene M.D., Vacaru A.M., Olariu L., Rosoiu N., (2016)pH influence on different bovine testicular hyaluronidase determination assays, *Academy of Romanian Scientists, Annals Series on Biological Sciences*, 5(1)
5. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-superoxide-dismutase.html>
6. Aebi H.E., (1978), Catalase in Bergmeyer, HU, Methods in enzymatic analysis., *Weinheim: Verlag Chemie*, pp. 273-286
7. Sandell L.J., Aigner T., (2001), Articular cartilage and changes in Arthritis: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, **3**, pp. 107
8. Tallheden T., Bengtsson C., Brantsing C., Sjogren-Jansson E., Carlsson L., Peterson L., Brittberg M, Lindahl A., (2005), Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Research & Therapy*, **7**, R560
9. Olariu L., Pyatigorskaya N., Dumitriu B., Pavlov A., Vacaru A. M., Vacaru A.,(2016), In vitro chondro-restitutive capacity of Alflutop® proved on chondrocytes cultures, *Romanian Biotechnological Letters*, **22**(6), pp 12047 – 12053
10. Rosier R.N., O'Keefe R.J., Crabb I.D., Puzas J.E., (1989), Transforming growth factor beta; an autocrine regulator of chondrocytes, *Connect Tissue Res.*; **20** (1-4), pp. 295-301
11. Li T.F., O'Keefe R.J., Chen D., (2005), TGF-beta signaling in chondrocytes. *Front Biosci.*, **10**, pp. 681-8
12. Stem R., Asari A.A., Sugahara K.N., (2006), Hyaluronan fragments: an information-rich system., *Eur J Cell Biol*, **85**(8), pp. 699-715
13. Juranek I., Stem R., Soltes L., (2014), Hyaluronan peroxidation is required for normal synovial function; An hypothesis. *Medical Hypotheses* 82, pp. 662- 666
14. Rosoiu N, Lascarache Gh., A natural extraction drug used for the treatment of degenerative diseases, (1994), *Rev.Roum.Biochim.*, Ed. Academiei Romane, **31**, **1**, pp. 57-63
15. Rosoiu N., Nita R., Ene M.D., Constantinovici M., Olariu L., (2010), Certain bioactive effects of complexes rich in glycosaminoglycans obtained from small sea fish, *Roumanian Biotechnological Letters*, **15** (5), pp. 5566-5575
16. Li D, Wang W, (2012), Reactive Oxygen Species; The 2-Edged Sword of Osteoarthritis, *Am J Med Sci*, 344, Issue 6, 486-490
17. Goldring M. B., Otero M., Plumb D. A., Dragomir C., Favero M., Hachem K. El, Hashimoto Ko, Roach H. I., Olivotto E., Borzi R. M., Marcu K. B., (2011), Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism, *European Cells and Materials*, **21**, pg. 202-220

18. Bellucci F., Meini S., Cucchi P., Catalani C., Nizzardo A., Riva A., Guidelli G. M., Ferrata P., Fioravanti A., Maggi C.A., (2013), Synovial fluid levels of bradykinin correlate with biochemical markers for cartilage degradation and inflammation in knee osteoarthritis; *Osteoarthritis and Cartilage*, **21**, pp. 1774-1780
19. Schuerwegh A. J., Dombrecht E. J., Stevens W. J., Van Offel J. F., Bridts C.H., De Clerck L. S., (2003), Influence of pro-inflammatory (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function, *OsteoArthritis and Cartilage, Biomechanics and Cartilage Inflammation*, **11**, 681-687)
20. Guilak F., Fermor B., Keefe F.J., Kraus V. B., Olson S. A., Pitsky D.S., Setton L. A., Weinberg J. B., (2004), The Role of Biomechanics and Inflammation in Cartilage Injury and Repair, *Clinical Orthopaedics and Related Research Number*, **423**, pp. 17-26
21. Olariu L., Dumitriu B., Buse E., Rosoiu N., (2015), The „in vitro” effect of Alflutop product on some extracellular signaling factors involved in the osteoarthritic pathology inflammation, *Analele AOSR*, **4** (2), pp. 7-18
22. Onyekwelu I., Goldring M.B., Hidaka C., (2009), Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration., *J Cell Biochem.*, **107**(3), pp. 383-392
23. Lefebvre V., Smits P., (2005), Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **75**(3), pp. 200-212
24. Olariu L., Vacaru A., Pyatigorskaya N., Vacant A. M., Pavlov A., Dumitriu B., Ene D. M., Craciun L. M., (2016), Original romanian product involved in cellular chondro -modulatory mechanisms. Euroinvent medalia de aur. Catalog EUROINVENT pg. 437.