УДК 6/6.72-018.3

Выявление активности цитокинов посредством ПЦР при посттравматическом остеоартрите, а также при воздействии интерлейкина-1β у генетически модифицированных мышей

А.Л.Торгомян

ЕГМУ им. М.Гераци, кафедра физиологии
0025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: остеоартрит, сустав, гиалиновый хрящ, мыши, прехондробласт, хондроцит

Интерлейкин-1β (ИЛ-1β) является цитокином, который синтезируется активированными синовиоцитами, мононуклеарными клетками и хондроцитами [16, 22, 25]. Уровень ИЛ-1β повышен у пациентов, страдающих остеоартритом (ОА) и ревматоидным артритом (РА) [5, 26]. Имеется ряд исследований, в которых внутрисуставное введение ИЛ-1β приводит к опуханию суставов, деградации коллагена и протеогликанов [1, 5, 18, 20]. Согласно имеющимся в литературе данным, краткосрочные (24 ч.) экспозиции бычьего суставного хряща ИЛ-1β не влияют на жизнеспособность хондроцитов, хотя и вызывают снижение содержания протеогликанов на 10%, однако данное изменение оказывает незначительное влияние на общую ультраструктуру ткани [23]. С точки зрения интеграции хрящевой ткани представляется важным отметить, что краткосрочное воздействие ИЛ-1β вначале подавляет синтез протеогликанов в суставном хряще и лишь затем значительно увеличивает нормальный уровень в течение 28 дней [17]. Данный факт был подтвержден исследованиями воздействия других провоспалительных медиаторов, в частности каррагенина [8]. Исследование Khan et al. позволило выявить, что кратковременное воздействие ИЛ-1β на бычий хрящ, с последующим 2-недельным культивированием, значительно улучшило хрящ-в-хрящ интеграцию, а проведенный ими анализ генов полимеразной цепной реакцией (ПЦР), обусловливающих катаболизм (ADAMTS4 и MMP13), выявил значительное повышение их активности, что позволяет сделать заключение о повышении активности процессов перестройки хрящевого матрикса [12].

Как правило, в литературных источниках ИЛ-1β рассматривался как катаболический медиатор в хрящевой ткани, активирующий ферменты, разрушающие внеклеточный матрикс [19, 21], и в то же время как фактор,

подавляющий синтез наиболее важных компонентов хряща – коллагена II типа (COL2A1) и аггрекана. С другой стороны, совершенно недавно было показано, что ИЛ-1β повышает уровень морфогенетического фактора BMP-2 [6], потенциально пытаясь сбалансировать свой катаболический эффект. При заболеваниях суставов ИЛ-1β, синтезированный синовиальными клетками [14] и хрящевыми хондроцитами [24], может способствовать как разрушению, так и восстановлению пораженного хряща, в зависимости от преобладания одного из его эффектов.

Таким образом, ИЛ-1β предположительно выполняет роль того фактора, который индуцирует преходящие, обратимые нарушения метаболизма в хрящевом матриксе, в результате которого происходит ремоделирование межклеточного вещества.

Нас интересовало воздействие ИЛ-1β на хондроциты, выделенные из суставного хряща мышей, которые обладали выраженной способностью к регенерации хряща или же были подвержены развитию ОА. Мы проанализировали изменения в экспрессии генов, ответственных за синтез хемокинов, индуцированные ИЛ-1β.

Как известно, хемокины являются мощными медиаторами воспаления и играют важную роль в патогенезе воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, ОА, рассеянный склероз и т.д [7]. Определенные хемокины обусловливают инфильтрацию лейкоцитами в синовиальной ткани и жидкости [15]. Они, как известно, участвуют в хемотаксисе, клеточной адгезии и миграции. Внеклеточный градиент хемокинов устанавливается посредством их связывания во внеклеточном матриксе с цепочками гликозаминогликанов [3], связываясь же с клеточной поверхностью, хемокины способны модулировать целостность интегринов [4]. Так, например, хемокин CXCL12 увеличивает активность металлопротеиназ (MMP-3) [10]. Описано более 50 хемокиновых лигандов и 18 хемокиновых рецепторов [13]. Большинство из них имеют белковую структуру с молекулярной массой около 8-10 кДа со свободными концами, состоящими из 2 молекул цистеина (CC) или разделенные одной аминокислотой (CXC) [10]. Механизмы их воздействия на процессы транскрипции генов пока остаются недостаточно изученными.

В данном исследовании был использован катаболический цитокин – ИЛ-1β. Было изучено воздействие различных концентраций с целью временного изменения метаболического состояния прехондробластов в монослойной культуре, предварительно выделенных из суставных поверхностей плечевой и бедренной костей генетически рекомбинантных мышей штаммов 6 и 33.

Посредством ПЦР была исследована активность ряда генов, являющихся маркерами хондрогенеза, провоспалительными цитокинами, хемокинами, металлопротеиназами и т.д., у потомства рекомбинантных чистокровных линий мышей (LG и SM), в частности у штаммов 6 и 33. Актив-

ность генов была изучена в монослойных культурах прехондробластов и хондроцитов, выделенных из суставного хряща оперированных и не оперированных (контроль) коленных суставов, а также в монослойных культурах прехондробластов, выделенных с суставной поверхности головки бедренной и плечевой кости при воздействии различных концентраций ИЛ-1β. Результаты, полученные посредством количественной ПЦР, были подтверждены электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

Материал и методы

Хирургическая индукция ОА

Мыши (самцы) были анестезированы внутрибрюшинной инъекцией кетамина (100 мг/кг), ксилазина (20 мг/кг) и ацепромазина (10 мг/кг) в возрасте 10 недель. Дестабилизация медиального мениска была произведена в правом коленном суставе посредством перерезки медиальной *менискo-тибиальной* связки [9]. Суставная капсула была вскрыта небольшим разрезом медиальнее связки надколенника, и связка перерезана микрохирургическими ножницами. Контролем являлся левый коленный сустав.

Выделение прехондробластов и хондроцитов из гиалинового хряща

Мыши были забиты на 8-й неделе после хирургического вмешательства. Гиалиновый хрящ с поверхности головки бедренной и плечевой кости был подвергнут последовательному воздействию проназы (70 Ед/ мл$^{-1}$, 1 час при 37^{0}C) и коллагеназы (300 Ед/ мл $^{-1}$, 3 часа при 37^{0}C). Выделенные клетки были культивированы в чашках, предварительно покрытых фибронектином, с целью отделения прехондробластов. Через 20 мин при 37^{0}C среда с неадгезированными клетками была удалена и замещена новой питательной средой, содержащей DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), пенициллин 10 000 мг/мл$^{-1}$, стрептомицин 10 000 мг/мл $^{-1}$, 0.1 мМ аскорбиновой кислоты, 0.5 мг/мл $^{-1}$ L-глюкозы, 100 мМ HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глютамина и 10% FBS (fetal bovine serum). Суспензия с хондроцитами также помещалась в чашки с указанной питательной средой. Адгезированные прехондробласты и хондроциты содержались до достижения состояния конфлюентности. Питательная среда, стимулирующая хондрогенез, заменялась каждый второй день. Неокрашенные монослойные культуры прехондробластов и хондроцитов были изучены фазово-контрастным микроскопом на 10-й и 20-й дни после посева. С целью исследования воздействия различных концентраций ИЛ-1β данный цитокин добавлялся в питательную среду в концентрации 0.01ng, 0.1ng и 1 ng на 1 мл среды соответственно. Контролем являлись клетки, которые содержались в хондрогенной среде без ИЛ-1β.

ПЦР (PCR) анализ

Монослойные культуры хондроцитов и прехондробластов были подвергнуты qPCR исследованию согласно протоколу, описанному Brophy et al. [2]. Экстракция РНК была осуществлена с использованием тризола. Затем была произведена ПЦР с обратной транскрипцией и последующая количественная ПЦР (qPCR) с целью определения активности целевых генов: col 2a1, Sox 9 , Il 1a, Il 1b, CCL 2, CCL 3, CCL 4, CCL 5, CCL 20, CXCL 1, MMP 3, MMP 13 и аггрекана (Aggr). С целью подтверждения результатов была проведена электрофоретическая детекция продуктов амплификации на наличие фрагментов РНК.

Результаты и обсуждение

На снимках, полученных фазово-контрастным микроскопом, видны прехондробласты и хондроциты, выделенные из суставного хряща мышей штаммов 6 и 33, содержащиеся в хондрогенной среде.

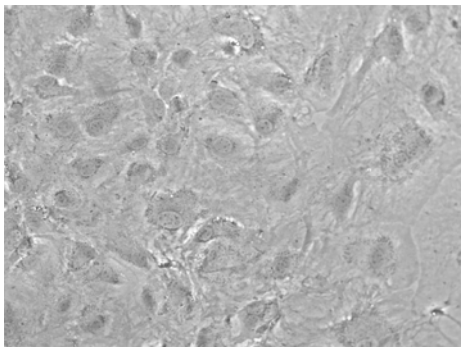


Рис.1а. Хондроциты, штамм 6 (10 дней)

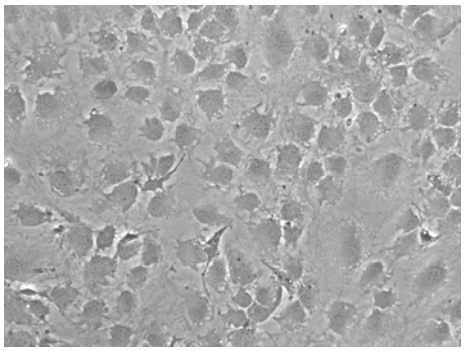


Рис.2а. Хондроциты, штамм 33 (10 дней)

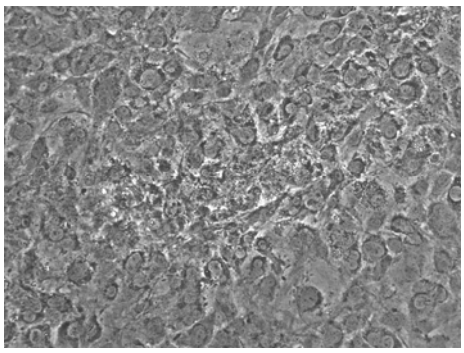


Рис.1б. Хондроциты, штамм 6 (20 дней)

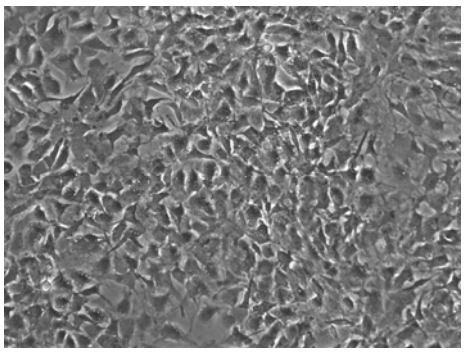
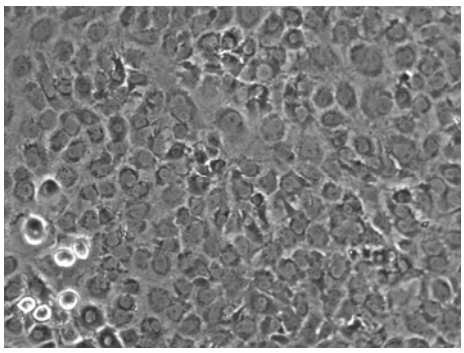


Рис.2б. Хондроциты, штамм 33 (20 дней)



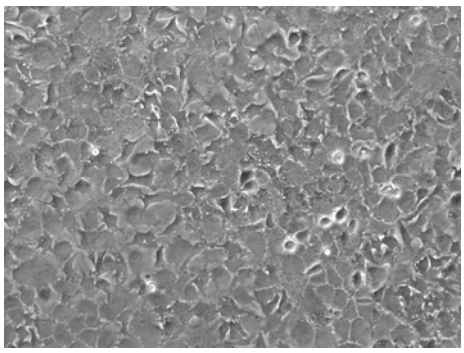


Рис.1в. Прехондробласты, штамм 6 (20 дней) Рис.2в. Прехондробласты, штамм 33 (20 дней)

Так, на 10-й день исследования хондроциты еще не достигли конфлюэнтности, однако уже можно отметить отличия в клеточной структуре, хондроциты штамма 6 обладают более светлыми ядрами и фибробластоподобной морфологией, характерной для хондроцитов, содержащихся в монослойной культуре (рис. 1а). У хондроцитов штамма 33 наблюдается большее количество отростков (2а). Данные отличия сохраняются и на 20-й день по достижению клетками конфлюэнтности (1б, 2б). В монослойных культурах прехондробластов как штамма 6, так и штамма 33 наличие крупных, светлых ядер с выраженными ядрышками позволяет предположить, что данные клетки являются метаболически более активными, чем хондроциты (рис. 1в, 2в).

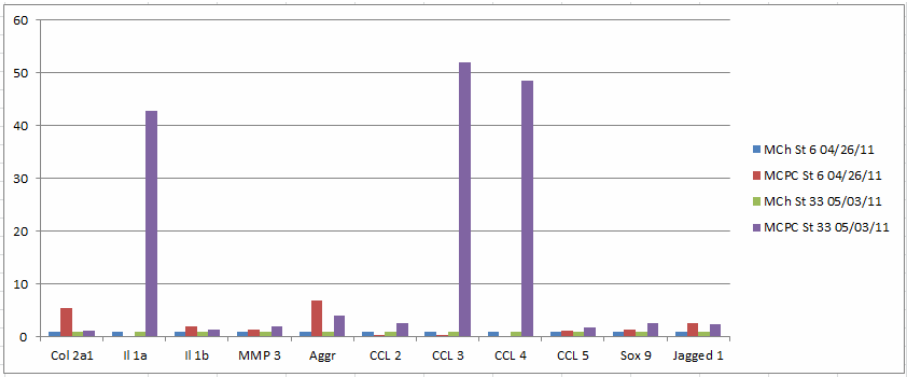


Рис. 3. Активность различных генов в монослойных культурах прехондробластов (MCPC) и хондроцитов (MCh), выделенных из суставного хряща мышей штаммов 6 и 33 (St 6, 33)

В результате проведенного ПЦР анализа активности целевых генов (col 2a1, Sox 9 , Il 1a, Il 1b, CCL 2, CCL 3, CCL 4, CCL 5, CCL 20, CXCL 1, MMP 3, MMP 13 и аггрекана – Aggr), согласно данным, приведенным в соответствующем графике (рис. 3), очевидно, что у мышей штамма 6 отмечается повышенный уровень активности генов, ответственных за

хондрогенез (col 2a1, Aggr), в прехондробластах в сравнении с хондроцитами, выделенными из того же суставного хряща, в то же время наблюдается пониженный уровень провоспалительных цитокинов, хемокинов и металлопротеиназ. С другой стороны, в прехондробластах, выделенных из суставного хряща мышей штамма 33, наблюдается повышенная активность как провоспалительных цитокинов, хемокинов, так и металлопротеиназ, в сравнении с хондроцитами. Прехондробласты обоих штаммов обладают активностью Jagged, который является специфическим маркером стволовых клеток.

Была также изучена активность тех же генов в монослойных культурах хондроцитов, выделенных из коленных суставов мышей штаммов 6 и 33, оперированных с целью индукции посттравматического ОА. Контролем служили хондроциты из неоперированного сустава того же животного.

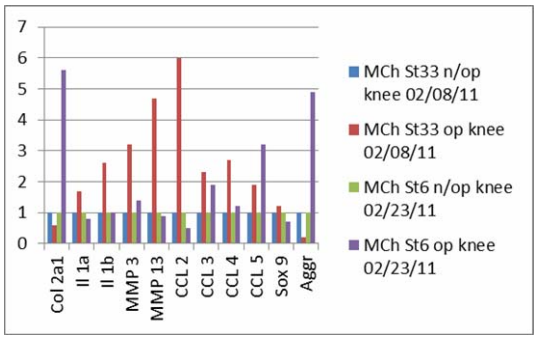


Рис. 4. Активность целевых генов в хондроцитах (MCh), выделенных из оперированных коленных суставов в сравнении с неоперированными, у мышей штаммов 6
(St 6) и 33 (St 33)

В результате проведенной количественной ПЦР было выявлено, что клетки в прооперированных суставах мышей штамма 6 обладали более высокой активностью генов, способствующих репарации хрящевой ткани и стимулирующих синтез коллагена II типа и аггрекана (col 2a1, Aggr). В то время как хондроциты суставного хряща мышей штамма 33 хотя и являются метаболически более активными клетками, однако вырабатывают преимущественно провоспалительные цитокины, хемокины и металлопротеиназы (рис. 4), что в итоге приводит к преобладанию процессов деградации хрящевой ткани и, соответственно, развитию посттравматического ОА.

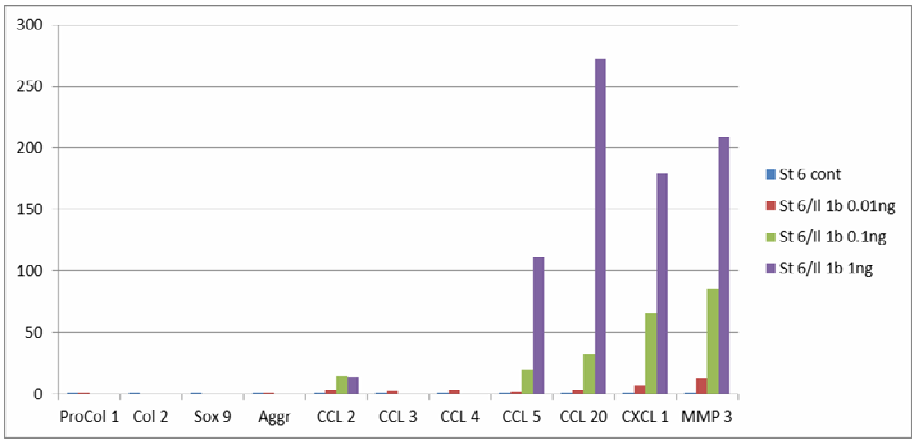


Рис. 5. Воздействие различных доз интерлейкина-1β (Il 1b) на хондроциты штамма 6 (St 6)

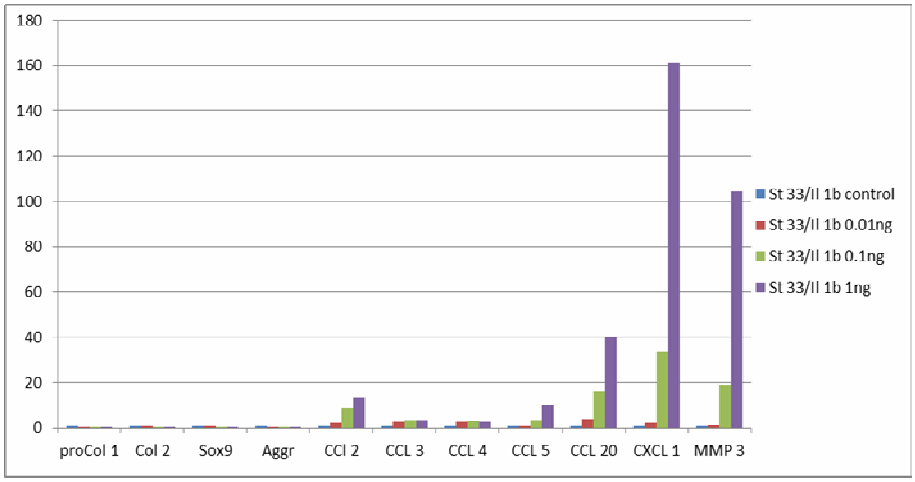


Рис. 6. Воздействие различных доз интерлейкина-1β (Il 1b) на хондроциты штамма 33 (St 33)

При исследовании воздействия различных доз ИЛ-1β (Il 1b) на хондроциты штаммов 6 (St 6) и 33 (St 33), было выявлено, что на повышение количества ИЛ-1β клетки реагируют активацией синтеза хемокинов CCL 2, CCL 5, CCL 20, CXCL 1 и металлопротеиназы MMP 3 как у мышей штамма 6, так и у штамма 33, в то же время отмечается подавление синтеза коллагена I и II типа и аггрекана.

Однако при этом необходимо отметить более сильную реакцию хондроцитов, выделенных из суставного хряща мышей штамма 6, чем штамма 33 (рис. 5, 6).

Кроме того, с целью подтверждения результатов количественной ПЦР была осуществлена электрофоретическая детекция продуктов ампли-

фикации на наличие фрагментов РНК, которая позволила выявить наличие всех целевых генов в прехондробластах и хондроцитах, выделенных из суставного хряща мышей штаммов 6 и 33.

Таким образом, проведенное исследование активности целевых генов в штаммах 6 и 33 подтверждает предыдущие исследования по заживлению раны ушной раковины, дефекта суставного хряща и развитию посттравматического ОА. Так, мыши штамма 6, обладающие выраженной способностью к регенерации как ушного дефекта, так и поврежденного суставного хряща, в то же время не подвержены развитию посттравматического ОА. С другой стороны, мыши штамма 33, будучи потомками тех же генетически модифицированных, чистокровных линий мышей LG и SM, не обладают способностью восстанавливать поврежденные хрящевые ткани и в ответ на дестабилизацию медиального мениска у них развивается ОА. Исследования активности генов позволили выявить генетический субстрат, ответственный за данные различия. Так, у мышей штамма 6 хондроциты и их предшественники обладают повышенной активностью синтеза коллагена II типа и аггрекана, являющихся основными структурными элементами здорового гиалинового хрящя. В то же время, основной реакцией хрящевых клеток штамма 33 является усиление синтеза провоспалительных цитокинов, хемокинов и металлопротеиназ, что в итоге, приводит к развитию воспалительной реакции и преобладанию процесса деградации хрящевого матрикса. Введение же ИЛ-1β приводит к активации синтеза хемокинов, что позволяет рассматривать его как катаболический медиатор в хрящевой ткани, активирующий ферменты, разрушающие внеклеточный матрикс [19, 21] и подавляющий синтез наиболее важных компонентов хряща – коллагена II типа (COL2A1) и аггрекана. Повышенная активность прехондробластов в сравнении с хондроцитами позволяет рассматривать их, как идеальный субстрат, который может быть использован в будущем с целью восстановления дефектов хрящевой ткани, пораженной ОА.

Данное исследование было финансировано программой Фулбрайта при поддержке Бюро по Вопросам Образования и Культуры Госдепартамента США и осуществлено в Университете им. Вашингтона, США, а также в университете Суонси, Великобритания, при поддержке Государственного комитета по науке Министерства образования и науки РА (тематическое финансирование 13-3A042).

Поступила 29.08.14

ՊՇՌ եղանակով ցիտոկինային ակտիվության բացահայտում հետտրավմատիկ օստեոարթրիտի ժամանակ, ինչպես նաև IL-1β-ի ազդեցությունը գենետիկորեն մոդիֆիկացված մկների մոտ

Ա.Լ. Թորգոմյան

Քանակական ՊՇՌ-ի միջոցով պարզվել է, որ շտամ 6 մկների խոնդրոցիտները և իրենց նախորդները օշժտված են կոլագեն 2 տիպի և ագրեկանի բարձր ակտիվությամբ: Սրանք առողջ հիալինային աճառի հիմնական կառուցվածքային տարրերն են: Միևնույն ժամանակ, շտամ 33 մկների աճառային բջիջների մոտ ակտիվանում է բորբոքային ցիտոկինների, քեմոկինների և մետաղապրոտեինազների սինթեզը, որն ի վերջո հանգեցնում է բորբոքային պատասխանի զարգացմանը և աճառային մատրիքսի դեգրադացիայի գերակշռությանը: IL-1β-ի ներարկումը ակտիվացնում է քեմոկինների սինթեզը, ինչը թույլ է տալիս այն դիտելու որպես աճառային հյուսվածքի կատաբոլիկ մեդիատոր: IL-1β նպաստում է միջբջջային նյութը քայքայող ֆերմենտների ակտիվացմանը և ճնշում է 2 տիպի կոլագենի և ագրեկանի սինթեզը, որոնք աճառային մատրիքսի կարևորագույն բաղադրիչներն են: Պրեխոնդրոբլաստների ավելի բարձր ակտիվությունը ի համեմատ խոնդրոցիտների, թույլ է տալիս դրանք համարել կատարյալ նյութ, որը հետագայում կարող է օգտագործվել օստեոարթրիտով վնասված աճառը վերականգնելու նպատակով:

PCR study of cytokine activity during post-traumatic osteoarthritis, as well as interleukin-1β effects in genetically modified mice

A.L. Torgomyan

By quantitative PCR we revealed that the mice strain 6 chondrocytes and their stem cells have higher collagen type II and aggrecan activity, which are the main structural components of healthy hyaline cartilage. At the same time, in strain 33 the main reaction of cartilage cells is increased synthesis of pro-inflammatory cytokines, chemokines and metalloproteinases, which ultimately leads to the development of the inflammatory response and cartilage matrix degradation predominance. Injection of IL-1β activates the synthesis of chemokines, which allows to consider it as a catabolic mediator of cartilage tissue activating enzymes degrading extracellular matrix and suppressing the

synthesis of most important cartilage components – type II collagen (COL2A1) and aggrecan. Chondroprogenitor cells' increased activity compared to chondrocytes allows them to be considered as an ideal substrate, which can be used in future for osteoarthritic cartilage defects restoration.

Литература

1. *Billinghurst R.C., Wu W., Ionescu M., Reiner A. et al.* Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. Arthritis Rheum., 2000; 43: 664-672.
2. *Brophy R.H., Rai M.F., Zhang Z., Torgomyan A., Sandell L.J.* Molecular analysis of age and sex-related gene expression in meniscal tears with and without a concomitant anterior cruciate ligament tear. J. Bone Joint Surg. Am., 2012; 94(5):385-93.
3. *Cecil D.L., Johnson K., Rediske J., Lotz M., et al.* Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products. J. Immunol., 2005;175: 8296-8302.
4. *Constantin G., Majeed M., Giagulli C. et al.* Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. Immunity, 2000;13:759-769.
5. *Farahat M.N., Yanni G., Poston R., Panayi G.S.* Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Ann. Rheum. Dis., 1993; 52: 870-875.
6. *Fukui N., Zhu Y., Maloney W.J., Clohisy J., Sandell L.J.* Stimulation of BMP- 2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. J. Bone Joint Surg. Am., 2003;85-A(Suppl 3):59-66.
7. *Gerard C., Rollins B.J.* Chemokines and disease. Nat. Immunol., 2001;2: 108-115.
8. Gillard G.C., Lowther D.A. Carrageenin-induced arthritis. II. Effect of intraarticular injection of carrageenin on the synthesis of proteoglycan in articular cartilage. Eur. Cell. Mater., 2011;22:190-201.
9. *Glasson S.S.* In vivo osteoarthritis target validation utilizing genetically-modified mice. Curr. Drug. Targets, 2007;8:367-376.
10. *Haringman J.J., Ludikhuize J., Tak P.P.* Chemokines in joint disease: the key to inflammation? Ann. Rheum. Dis., 2004; 63:1186-1194.
11. *Kanbe K., Takagishi K., Chen Q.* Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cellderived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. Arthritis Rheum., 2002;46:130-137.
12. *Khan I.M., Gonzalez L.G., Francis L. et al.* Interleukin-1β enhances cartilage-to-cartilage integration. Eur. Cell. Mater., 2011; 22; 190 – 201.
13. *Mantovani A., Bonecchi R., Locati M.* Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. Nat. Rev. Immunol., 2006;6:907-918.
14. *Martel-Pelletier J., Alaaeddine N., Pelletier J.P.* Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. Front. Biosci., 1999;4:694-703.
15. *Mobasheri A., Vannucci S.J., Bondy C.A. et al.* Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. Histol. Histopathol., 2002;17: 1239-1267.
16. *Ollivierre F., Gubler U., Towle C.A., Laurencin C., Treadwell B.V.* Expression of IL-1 genes in human and bovine chondrocytes: a mechanism for autocrine control of cartilage matrix degradation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1986; 141: 904-911.
17. *Page Thomas D.P., King B., Stephens T., Dingle J.T. In vivo* studies of cartilage regeneration after damage induced by catabolin/interleukin-1. Ann. Rheum. Dis., 1991, 50: 75-80.

18. *Pettipher E.R., Higgs G.A., Henderson B*. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986; 83: 8749-8753.
19. *Poole A.R., Guilak F., Abramson S.* Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz R.W., Altman R.D., Hochberg M.C., Buckwalter J.A., Goldberg V.M., Eds. Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. 4th ed. Philadelphia: Kluwer; 2007:27-49.
20. *Saklatvala J., Curry V.A., Sarsfield S.J*. Purification to homogeneity of pig leucocyte catabolin, a protein that causes cartilage resorption *in vitro*. Biochem. J., 1983; 215: 385-392.
21. *Sandell L.J., Heinegard D., Hering T.M*. Cell biology, biochemistry, and molecular biology of articular cartilage in osteoarthritis. In: Moskowitz R.W., Altman R.D., Hochberg M.C., Buckwalter J.A., Goldberg V.M., Eds. Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. 4th ed. Philadelphia: Kluwer; 2007:73-106.
22. *Smith M.D., Triantafillou S., Parker A., Youssef P.P., Coleman M*. Synovial membrane infl ammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. J. Rheumatol., 1997; 24: 365-371.
23. *Stabellini G., De Mattei M., Calastrini C. et al.* Effects of interleukin-1β on chondroblast viability and extracellular matrix changes in bovine articular cartilage explants. Biomed. Pharmacother., 2003; 57: 314-319.
24. *Tiku K., Thakker-Varia S., Ramachandrula A., Tiku M.L.* Articular chondrocytes secrete IL-1, express membrane IL-1, and have IL-1 inhibitory activity. Cell. Immunol., 1992;140:1-20.
25. *Towle C.A., Hung H.H., Bonassar L.J., Treadwell B.V., Mangham D.C.* Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: A possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. Osteoarthritis Cartilage ,1997; 5: 293-300.
26. *Wood D.D., Ihrie E.J., Dinarello C.A., Cohen P.L*. Isolation of an interleukin-1-like factor from human joint effusions. Arthritis Rheum., 1983; 26: 975-983.