

ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ РАСЩЕПЛЕНИЯ КОЛЛАГЕНА В ХРЯЩЕ БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ ПРИ АКТИВАЦИИ ГЛИКОЛИЗА

Е. В. ЧЕТИНА*

научный сотрудник лаборатории генетики (зав. д.м.н., профессор В. А. Мякоткин) НИИ Ревматологии РАМН (директор академик РАМН, профессор Е. Л. Насонов)

Цель. Изучить влияние активаторов гликолиза дефероксамина (ДФО), CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ и мимозина на активность расщепления коллагена 2 типа коллагеназой в эксплантатах суставного хряща больных остеоартрозом (ОА)

Материалы и методы. В исследовании использовали хрящи 32 больных ОА, полученные после артропластики. Хрящи культивировали в присутствии 10–50 μM ДФО, CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ или мимозина. Активность расщепления коллагена 2 типа коллагеназой измеряли с помощью ELISA. Токсичность исследуемых соединений оценивали по ингибированию синтеза белка или ДНК с использованием меченых пролина или тимидина, соответственно.

Результаты. Культивирование эксплантатов хряща больных ОА в присутствии активаторов гликолиза ДФО, CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ или мимозина в концентрации 10–50 μM статистически достоверно снижало активность расщепления коллагена 2 типа коллагеназой. Активаторы гликолиза не оказывали токсического действия в исследуемых концентрациях.

Закключение. Активирование гликолиза в хондроцитах эксплантатов хряща больных ОА подавляет активность разрушения хрящевой ткани.

Ключевые слова: остеоартроз, суставной хрящ, расщепление



ВВЕДЕНИЕ

Остеоартроз (ОА) – это наиболее распространенное заболевание лиц пожилого возраста. Основным проявлением заболевания является эрозия суставного хряща, которая развивается вследствие повреждения и резорбции внеклеточного матрикса (ВКМ), окружающего хондроциты. ВКМ состоит преимущественно из коллагена второго типа и протеогликана аггрекана [19].

При ОА отмечается увеличение содержания свободных радикалов (СР), которые изменяют синтез и деградацию компонентов внеклеточного матрикса, а также обладают провоспалительными и иммуномодулирующими свойствами [10, 20]. В частности, СР могут вызывать повреждения всех компонентов матрикса путем прямой атаки или косвенно, путем уменьшения синтеза компонентов матрикса, индуцируя апоптоз, а также путем активации латентных металлопротеиназ. Кроме того, СР нарушают окислительно-восстановительные процессы, которые лежат в основе энергетического метаболизма хондроцитов [10].

В хондроцитах суставного хряща анаэробный гликолиз является центральным процессом генерации АТФ, а митохондриальное окислительное фосфорилирование обеспечивает физиологический резерв АТФ [11, 14]. Однако при ОА происходит нарушение метаболизма глюкозы [14], а недавний протеомный анализ хондроцитов больных ОА на поздней стадии заболевания показал снижение внутриклеточных уровней белков гликолиза – энлазы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и фруктозо-дифосфатредуктазы [17]. В связи с этим мы предположили, что факторы, активирующие гликолиз, могут остановить разрушение суставного хряща у больных ОА.

В настоящее время достаточно изучены несколько соединений, способных активировать гликолиз. К ним относятся прежде всего: 1) дефероксамин (ДФО), молекула которого состоит из одной молекулы ацетата, 2-х молекул сукцината и 3-х молекул α -амино-5-оксиамино-пентана и который продуцируется *Streptomyces pilosus*; 2) хлорид кобальта (CoCl_2); 3) сульфат ванадия [$\text{V}(\text{SO}_4)_2$] и 4) мимозин [β -N(3-окси-4-пиридон)- α -амино пропионат] – токсическая аминокислота, обнаруженная в больших количествах в листве и семенах *Leucaena glauca* или *Mimosa pubica*.

Механизмы действия активаторов гликолиза достаточно разнообразны. Прежде всего они повышают эффективность энергетического метаболизма путем стимуляции поглощения глюкозы благодаря синтезу белков-транспортёров глюкозы (в случае ДФО и мимозина) или благодаря инсулиноподобным свойствам (в случае $\text{V}(\text{SO}_4)_2$) [15]. Кроме того, активаторы гликолиза увеличивают экспрессию гликолитических ферментов: альдолазы, фосфоглицераткиназы, пируваткиназы и ангиогенных факторов (VEGF и эритропоэтина) [22]. Они воспроизводят эффект низкого парциального давления кислорода и индуцируют ответ на гипоксию вследствие активации транскрипционного фактора HIF1 α [9, 16]. Дополнительным механизмом активации гликолиза является ингибирование активности гидролиза АТФ посредством H^+ -АТФазы (в случае $\text{V}(\text{SO}_4)_2$) и увеличение концентрации ионов Mg^{+2} , которые принимают участие во всех реакциях переноса АТФ и активности протеинкиназ. При этом недостаток магния обычно сопровождается состоянием инсулинорезистентности, которое часто наблюдается у больных ОА [14].

Кроме того, ингибиторы гликолиза обладают антиапоптозной активностью вследствие хелатирования (ДФО, CoCl_2) или перемещения (CoCl_2), несвязанного с трансферрином железа и подавлением образования токсических гидроксильных радикалов в реакции Хабер-Вайса [6, 10]. Наконец, активаторы гликолиза способны ингибировать пролиферативную активность клеток путем подавления зависимой от железа рибонуклеотид редуктазы, необходимой для синтеза ДНК или понижения экспрессии циклинов и циклин-зависимой киназы 2 [12].

В связи с этим в данной работе было исследовано влияние активаторов гликолиза ДФО, CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ и мимозина на активность расщепления коллагена 2 типа коллагеназой в эксплантатах суставного хряща больных ОА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка суставного хряща больных ОА

Суставной хрящ дистальной части бедренной кости больных ОА получали после полного удаления коленного сустава при артропластике. В исследовании использованы хрящи 32 пациентов (6 мужского пола, средний возраст

* etchetina@mail.ru

73,7±6,4, возраст варьировал от 66 до 80 лет; 26 женского пола, средний возраст 77,2±11,3, возраст варьировал от 50 до 90 лет). Заболевание ОА было предварительно диагностировано в соответствии с критериями Американской Коллегии Ревматологии [4].

Хрящи готовили как описано ранее [1]. Хрящи больных ОА трижды отмывали ДМЕМ-А (Дюльбекко модифицированной средой Игла-А) (Life Technologies), содержащей также 20 ммоль/л буфера HEPES, pH 7,4, 45 ммоль/л NaHCO_3 , 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина и 150 мкг/мл гентамицин сульфата. Суставной хрящ, срезаемый с кости разрезали на фрагменты размером 2х2 мм². Использовали весь материал суставного хряща каждого пациента (степени разрушения от 4 до 12 по шкале Манкина), как описано ранее [7]. 50-70 мг (5-7 кубиков) предварительно культивировали на планшетах (48 лунок от Costar 3548) в течение 48 ч. при 37°C в 1 мл ДМЕМ-А в атмосфере 95% воздуха и 5% CO_2 .

Культивирование хрящевых эксплантатов

Среду меняли через 48 часов (этот день, день 0, считали началом опыта), а затем – через каждые 4 дня. Свежеприготовленные растворы ДФО, CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ и мимозина (Sigma) в конечной концентрации в 10-50 μM или 10 нг/мл TGF β 2 (R&D Systems) добавляли в среду А при каждой ее смене.

Хрящи (каждый опытный вариант в трех повторностях) культивировали 16 дней. Культуральную среду меняли каждые 4 дня и собирали ее при каждой смене, а затем хранили при -20°C до использования. По окончании опыта в образцах измеряли активность расщепления коллагена.

Определение активности расщепления коллагена 2 типа коллагеназой с использованием фермент-зависимого иммуносорбентного метода (ELISA)

Эксплантаты хрящей после 16 дней культивирования экстрагировали α -химотрипсином, чтобы перевести в раствор, не переваривая, денатурированный коллаген, включая карбокси-терминальный нео-эпитоп COL2-3/4C (C1,2C), образующий при расщеплении коллагена 2 типа коллагеназой. Его содержание в культуральной среде и α -химотрипсиновом экстракте хряща определяли посредством ELISA [5, 7]. Суммарный нео-эпитоп расщепления в хряще и среде рассчитывали суммированием данных анализа каждого образца среды и экстракта хряща. Результаты рассчитывали в пикомолях эпитопа на мг сырого веса хряща. Молекулярная масса стандартного пептида эпитопа равна 608 дальтон.

Тесты на токсичность

Токсичность ингибиторов гликолиза оценивали по степени ингибирования биосинтеза белка или ДНК эксплантатами хряща больных ОА в присутствии меченых [³H] L-пролина и [³H] тимидина, соответственно, как описано ранее [7].

Статистический анализ

Данные количественных экспериментов представлены как среднее арифметическое ± стандартная вариация. Анализы проводили в трех повторностях. Для статистической обработки результатов использовали тест Ман-Уитни (t-тест). Значения вероятности ошибки менее 0,05 считались достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Культивирование эксплантатов хряща больных ОА в присутствии соединений, активирующих процесс гликолиза: ДФО, CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ или мимозина в концентрации 10 μM приводило к подавлению расщепления коллагена 2 типа кол-

лагеназой у больных ОА. Типичный пример представлен на рис. 1. При этом степень ингибирования активности расщепления коллагена оказалась сопоставима с действием 10 μM TGF β 2, который, как нами было показано ранее, способен статистически достоверно подавлять разрушение матрикса суставного хряща при ОА [1].

Более детальные исследования действия активатора гликолиза 10 μM ДФО у группы из 10 больных ОА показали, что это соединение статистически достоверно ($p=0,01$) понижает активность расщепления коллагена у этих больных (рис. 2а). Аналогичные исследования влияния 10 μM CoCl_2 у группы из 14 больных ОА показали, что это соединение также способно статистически достоверно ($p=0,04$) ингибировать расщепление коллагена в эксплантатах хряща больных ОА (рис. 2б).

Однако, не все исследованные больные ОА оказались чувствительны к действию 10 μM ДФО, поскольку в ряде случаев снижения коллагеназной активности в его присутствии не наблюдалось (рис. 3). При этом следует отметить, что такие больные оказались также нечувствительны к действию 10 μM TGF β 2.

Анализ влияния концентрации ДФО на активность расщепления коллагена показал, что ингибирование активности расщепления коллагена повышалось с увеличением концентрации ДФО. В качестве типичного примера на рис. 4 продемонстрировано ступенчатое снижение активности расщепления коллагена при увеличении концентрации ДФО от 10 до 50 μM в эксплантатах хряща больной ОА.

Тесты на токсичность препаратов ингибиторов гликолиза показали, что ДФО не снижает скорость белкового синтеза (рис. 5), а также не подавляет пролиферативную активность хондроцитов, поскольку не ингибируют синтез их ДНК (рис. 6) в широком ряду концентраций (от 10 до 50 μM). Аналогичные результаты были получены также при культивировании эксплантатов хряща больных ОА в присутствии CoCl_2 или $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ в концентрации 50 μM (рис. 5, 6). Это свидетельствует об отсутствии токсического действия исследуемых препаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Метаболизм клеток в тканях сустава при нормальных и патологических условиях находится под комплексным контролем окружающей среды, которая включает в дополнение к растворимым медиаторам цитокинам и ростовым факторам также механические стимулы и свободные радикалы [10]. При ОА метаболические нарушения заключаются в недостатке снабжения питательными веществами суставного хряща и ослаблении гликолиза – основного пути генерации энергии суставными хондроцитами [17]. Недостаток энергии снижает активность биосинтетических процессов в клетках и усиливает дегенерацию ВКМ.

В данном исследовании мы впервые показываем, что активность расщепления коллагена коллагеназой можно ингибировать соединениями, способными активировать гликолиз – ДФО, CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ и мимозином. При этом эффективность подавления коллагеназной активности ингибиторами гликолиза сопоставима с его ингибированием TGF β 2. Как мы показали ранее, TGF β 2 является наиболее эффективным ростовым фактором в ингибировании расщепления коллагена у больных ОА, который одновременно изменяет фенотипические свойства суставных хондроцитов [1]. Поэтому нельзя исключить, что при ингибировании коллагеназной активности ингибиторами гликолиза также происходит блокирование гипертрофии хондроцитов хряща больных ОА.

Другим возможным механизмом позитивного влияния ингибиторов гликолиза на состояние ВКМ может быть ак-

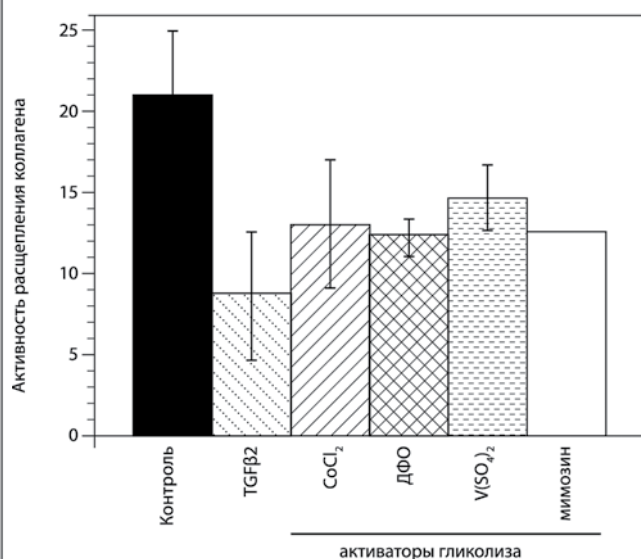


Рис. 1. Ингибирование активности расщепления коллагена активаторами гликолиза в концентрации 10μM или TGFβ2 в эксплантатах хряща больного ОА в возрасте 73 лет

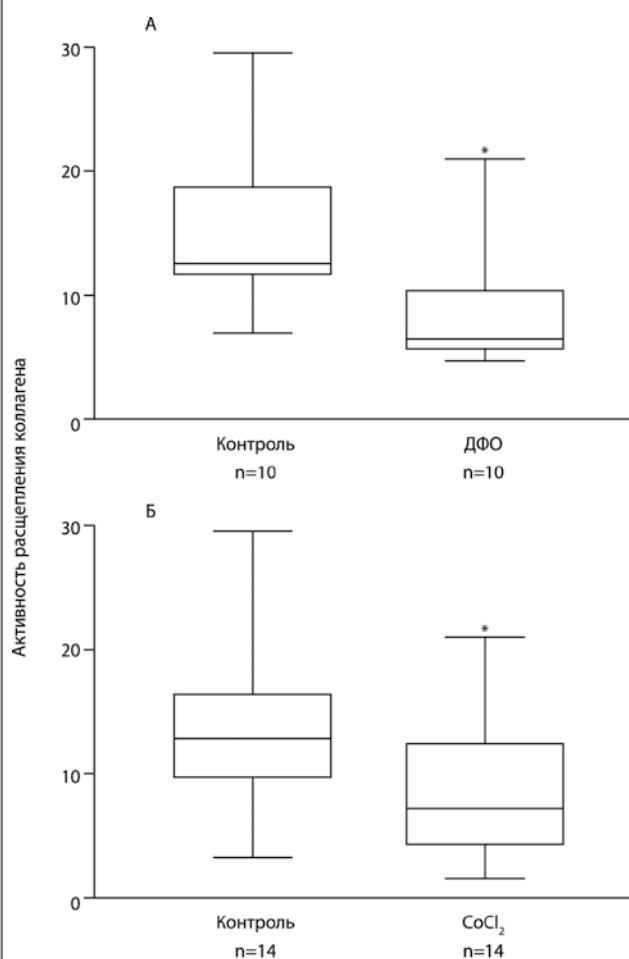


Рис. 2. Ингибирование активности расщепления коллагена активаторами гликолиза дефероксамина (ДФО) (А) или CoCl₂ (Б) в эксплантатах хряща больных ОА

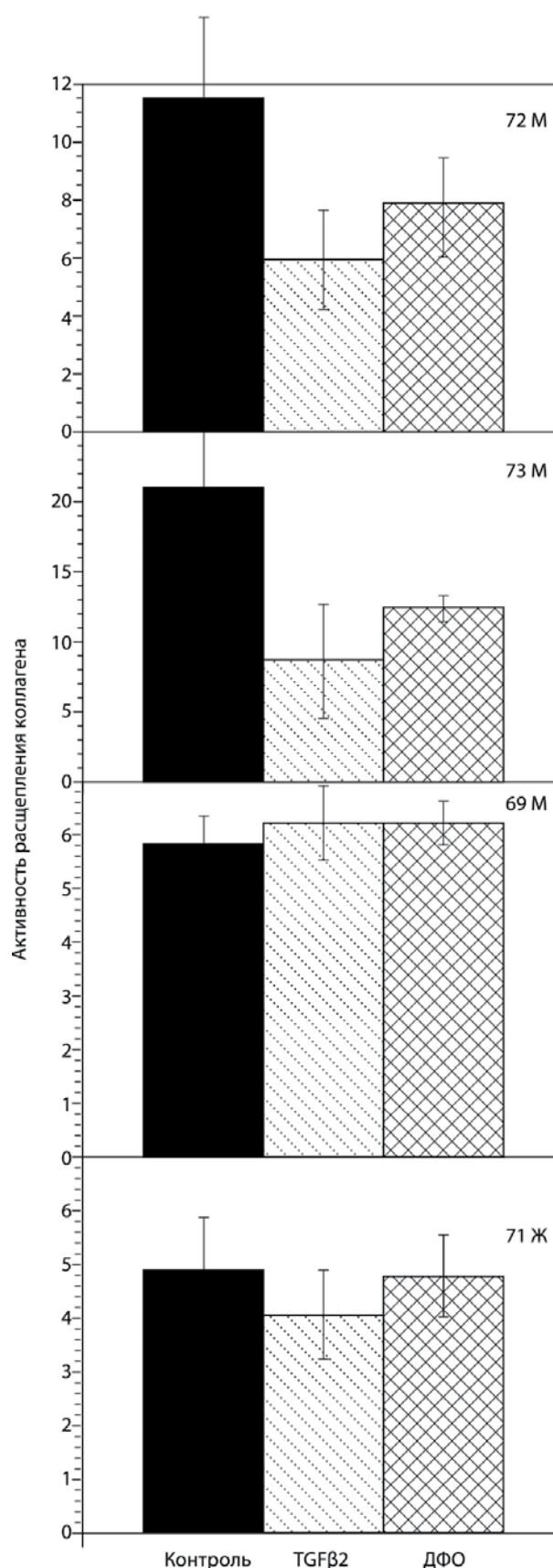


Рис. 3. Ингибирование активности расщепления коллагена TGFβ2 или дефероксамином (ДФО) в эксплантатах хряща больных ОА

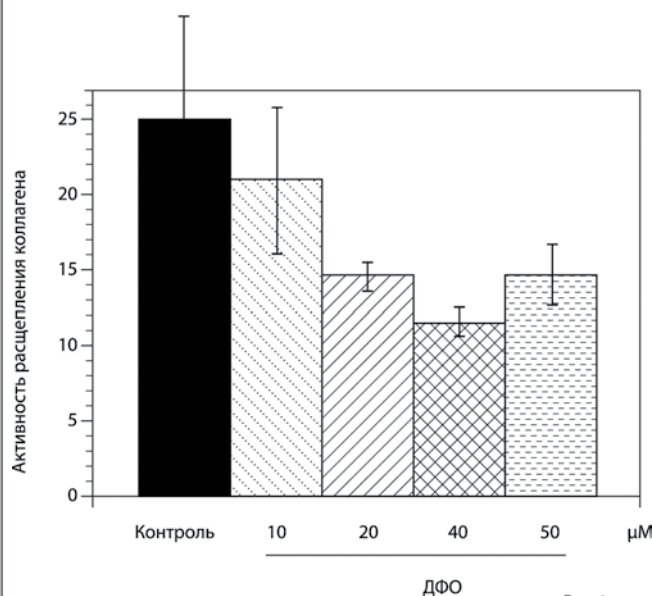


Рис. 4. Влияние концентрации дефероксина (ДФО) на активность расщепления коллагена в эксплантатах хряща больного ОА в возрасте 58 лет

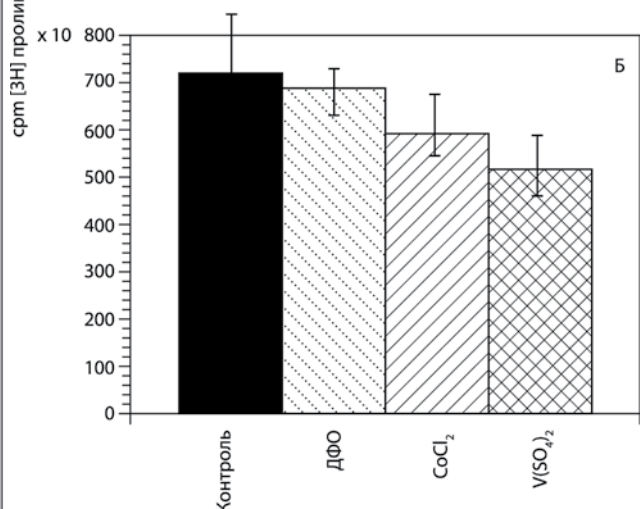
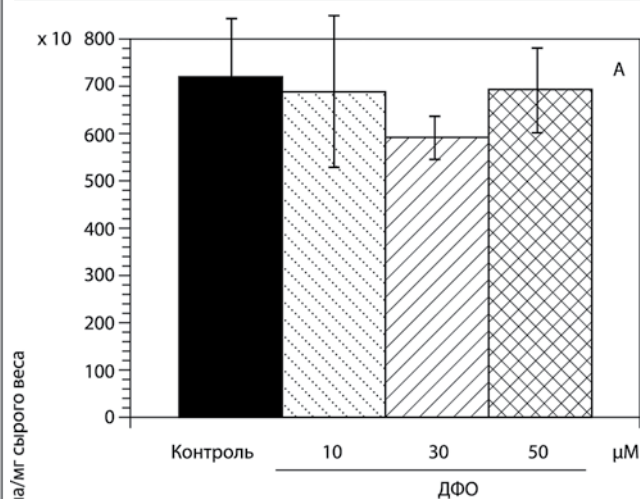


Рис. 5. Активность включения [3H]-пролина в присутствии дефероксина (ДФО) в концентрации 10-50 μM (А) или ДФО, CoCl₂ или V(SO₄)₂ в концентрации 50 μM (Б) в эксплантатах хряща больной ОА в возрасте 62 лет

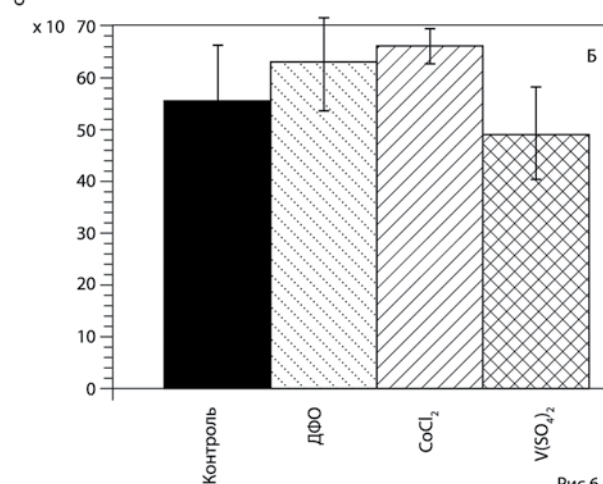
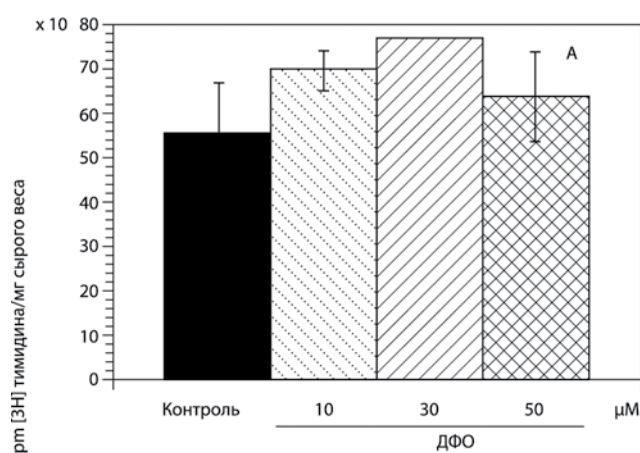


Рис. 6. Активность включения [3H]-тимидина в присутствии дефероксина (ДФО) в концентрации 10-50 μM (А) или ДФО, CoCl₂ или V(SO₄)₂ в концентрации 50 μM (Б) в эксплантатах хряща больной ОА в возрасте 62 лет

тивация этими соединениями, в частности CoCl₂, индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора (HIF)1α, поскольку известно, что повышение экспрессии HIF1α приводит к увеличению синтеза компонентов матрикса – коллагена 2 типа и агрекана, а также подавлению активности металлопротеиназ [8, 18].

Кроме того, антиапоптозная активность активаторов гликолиза может также способствовать улучшению состояния хряща при ОА, поскольку ранее мы и другие исследователи сообщали о гибели продуцирующих матрикс хондроцитов посредством апоптоза в хряще больных ОА [2, 3, 13], а недавние исследования выявили, что именно HIF1α, индуцируемый активаторами гликолиза, способствует поддержанию жизнеспособности хондроцитов хряща при ОА [21]. Кроме того, способность активаторов гликолиза, а именно хелаторов железа (ДФО и CoCl₂), блокировать генерацию СР [10], также может способствовать улучшению состояния хряща больных ОА.

Следует отметить, что применение активаторов гликолиза в терапии ОА облегчается тем, что некоторые из них уже используются в медицинской практике. Так, например, Десферал (коммерческое название метан-сульфоновой соли ДФО) является эффективным терапевтическим средством при некоторых заболеваниях, сопровождающихся избыточным содержанием свободного железа, хронической анемии при ревматоидном артрите, острым отравлении железом, β-талассемии и некоторых

видах раковых заболеваний (нейробластоме, лейкемии и ряде других) [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активаторы гликолиза – ДФО, CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ и мимозин способны значительно снижать активность расщепления коллагена коллагеназой в эксплантатах суставного хряща больных ОА, поэтому стимулирование процессов генерации энергии хондроцитами, в частности гликолиза, может оказаться новой терапевтической мишенью при лечении ОА.

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 09-04-01158-а).

SUMMARY

Aim. To study the effect of glycolysis activators deferrioxamine (DFO), CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ and mimosine on collagen cleavage activity by collagenase in osteoarthritic (OA) articular cartilage explants.

Materials and methods. 32 OA articular cartilages obtained after arthroplasty were examined in the study. Cartilages were cultured in the presence of 10-50 μM DFO, CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ or mimosine. Collagen cleavage activity was measured by ELISA. Inhibition of protein or DNA synthesis in the presence of $[^3\text{H}]$ -labeled proline or thymidine, respectively, was used for evaluation of examined agent toxicity.

Results. Glycolysis activators DFO, CoCl_2 , $\text{V}(\text{SO}_4)_2$ or mimosine were capable of inhibiting type II collagen cleavage activity in OA articular cartilage explants. The examined agents have shown no toxic effect in the concentrations used.

Conclusion. Glycolysis activation in articular chondrocytes may offer a means of inhibiting articular cartilage destruction in OA patients.

Keywords: osteoarthritis, articular cartilage, collagen cleavage, glycolysis inhibitors

ЛИТЕРАТУРА

- Четина Е.В., Пул А.Р. Роль ростовых факторов в подавлении разрушения коллагена и дифференциации хондроцитов при остеоартрозе // Вестник РАМН.- 2008.- № 5.- С. 15-21.
- Четина Е.В. Индукция расщепления коллагена под действием коллагенового пептида в хряще здоровых людей сопровождается активацией металлопротеиназ матрикса и дифференцировкой хондроцитов // Научно-практическая ревматология. – 2010. – № 5.-С. 47-53.
- Четина Е.В. Признаки дифференцировки хондроцитов при формировании ранних повреждений хряща у пожилых людей // Научно-практическая ревматология. – 2011. – № 1.- С. 33-35.
- Altman R., Asch E., Bloch D., et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee// Arthritis Rheum.- 1986.-V. 29.- P. 1039-49.
- Billinghurst R.C., Dahlberg L., Ionescu M. et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage// J Clin Invest.- 1997.- V. 99.-P. 1534-45.
- Chua A.C., Ingram H.A., Raymond K.N. et al. Multidentate pyridinones inhibit the metabolism of nontransferrin-bound iron by hepatocytes and hepatoma cells// Eur J Biochem.- 2003.- V. 270.- P. 1689-98.
- Dahlberg L., Billinghurst R.C., Manner P. et al. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest

with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1)// Arthritis Rheum.- 2000.- V. 43.-P. 673-82.

8. Duval E., Leclercq S., Elissalde J.M. et al. Hypoxia-inducible factor 1 α inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1 α -dependent redifferentiation of chondrocytes// Arthritis Rheum.- 2009.- V. 60.- P. 3038-48.

9. Ebert B.L., Firth J.D., Ratcliffe P.J. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences// J Biol Chem.- 1995.-V. 270.- P. 29083-9.

10. Henrotin Y.E., Bruckner P., Pujol J.P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage// Osteoarthritis Cartilage.- 2003.-V. 11.- P. 747-755.

11. Johnson K., Svensson C.I., Etten D.V. et al. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs// Arthritis Rheum.- 2004.- V. 50.-P. 1216-25.

12. Kicic A., Chua A.C., Baker E. Effect of iron chelators on proliferation and iron uptake in hepatoma cells// Cancer.- 2001.- V. 92.- P. 3093-110.

13. Kühn K., D'Lima D.D., Hashimoto S. et al. Cell death in cartilage// Osteoarthritis Cartilage.- 2004.-V. 12.-P.1-16.

14. 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.- V.17.- P.1239-67.

15. Peansukmanee S., Vaughan-Thomas A., Carter S.D. et al. Effects of hypoxia on glucose transport in primary equine chondrocytes in vitro and evidence of reduced GLUT1 gene expression in pathologic cartilage in vivo// J Orthop Res.- 2009.-V. 27.- P. 529-35.

16. Ouidir A., Planès C., Fernandes I. et al. Hypoxia upregulates activity and expression of the glucose transporter GLUT1 in alveolar epithelial cells// Am J Respir Cell Mol Biol.- 1999.- V. 21.-P.710-8.

17. Ruiz-Romero C., Carreira V., Rego I. et al. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis// Proteomics.- 2008.- V. 8.- P. 495-507.

18. Ströbel S., Loparic M., Wendt D. et al. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages// Arthritis Res Ther.- 2010.-V.12.- P. R34.

19. Tcheta E.V. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis// Arthritis (Hindawi).- 2011.- V. 2011.-P. 1-16.

20. Tillmann K. Pathological aspects of osteoarthritis related to surgery. Inflammation // 1984.- V. 8 Suppl.-P. S57-74.

21. Yudoh K., Nakamura H., Masuko-Hongo K. et al. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 α in the pathogenesis of osteoarthritis// Arthritis Res Ther.- 2005.-V. 7.-P. R904-14.

22. Zaman K., Ryu H., Hall D. et al. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin// J Neurosci.- 1999.- V. 19.- P. 9821-30.