

## СИНТЕЗ АГРЕКАНА И КОЛЛАГЕНА II ТИПА IN VITRO ХОНДРОЦИТАМИ ИЗ РАЗНЫХ ЗОН КОЛЕННОГО СУСТАВА БОЛЬНЫХ ГОНАРТРОЗОМ

<sup>1</sup>Щелкунова Е.И., <sup>1</sup>Воропаева А.А., <sup>1</sup>Русова Т.В., <sup>1</sup>Байтов В.С.

<sup>1</sup>ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьянна Минздрава России», Новосибирск, e-mail: elena-shelkunova@mail.ru

Методами иммуноцитохимии и флуоресцентной микроскопии исследовали синтетическую активность хондроцитов, выделенных из хряща разных топографических зон коленного сустава больных гонартрозом III-IV степени, различающихся выраженностью дегенеративных изменений. На 7-е сутки культивирования определяли активность синтеза хондроцитами агрекана и коллагена 2-го типа по интенсивности свечения Alexa Fluor 488. Наиболее интенсивно агрекан синтезировали клетки из ненагружаемой зоны (соответствует заднему краю внутреннего мышелка бедренной кости) по сравнению с хондроцитами из других зон. Хондроциты малонагружаемой (соответствует латеральному мышелку большой берцовой кости) и нагружаемой зоны (соответствует медиальному мышелку большой берцовой кости) демонстрируют пониженную активность синтеза агрекана. При визуальной оценке синтеза коллагена II типа показано, что наиболее интенсивно данный белок синтезируется хондроцитами нагружаемой и малонагружаемой зон. Неодинаковая синтетическая активность хондроцитов в отношении агрекана и коллагена 2-го типа может быть следствием изменений их метаболизма в связи с особенностями развития патологического процесса в суставном хряще разных топографических зон коленного сустава больных гонартрозом.

Ключевые слова: гонартроз, суставной хрящ, агрекан, коллаген II типа, иммуноцитохимия, флуоресцентная микроскопия

## THE IN VITRO AGGREGAN AND TYPE II COLLAGEN SYNTHESIS BY CHONDROCYTES FROM DIFFERENT KNEE JOINT ZONES OF THE PATIENTS WITH GONARTHROSIS

Schelkunova E.I., Voropaeva A.A., Rusova T.V., Baitov V.S.

<sup>1</sup>Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, e-mail: elena-shelkunova@mail.ru

Chondrocytes from different zones of the knee joint, differing in the degree of cartilage degeneration in knee osteoarthritis patients with stage III-IV was investigated by immunocytochemistry and fluorescence microscopy. The synthesis of aggrecan and type II collagen by chondrocytes from zones with different degrees of degeneration and physical load of the cartilage was determined in cell culture on the 7th day of culture. The most intensive synthesis of aggrecan was detected in the cell culture of the minimum loaded zone (rear edge meets the internal condyle of the femur). Chondrocytes from medium loaded zone (corresponding to the lateral condyle of the tibia) and from most loaded zone (corresponding to the medial condyle of the tibia) exhibit a reduced activity of aggrecan synthesis. Visual assessment of the synthesis of collagen type II showed that most intensively the protein is synthesized by chondrocytes from medium loaded and most loaded zone. Unequal synthetic activity of chondrocytes with respect to aggrecan and collagen type 2 may be due to changes in their metabolism due to the nature of the pathological process in the articular cartilage of different topographic zones of the knee joint of patients with knee osteoarthritis.

Keywords: gonarthrosis, articular cartilage, aggrecan, collagen type II, immunocytochemistry, fluorescence microscopy

Гонартроз – распространенное заболевание коленных суставов, дегенеративного характера, которое затрагивает все компоненты сустава, связанное с локальной потерей хрящевой ткани с течением времени. В настоящее время считается, что разрушение суставного хряща при остеоартрозе является результатом чрезмерной нагрузки, возрастных изменений и нарушения обмена веществ [4, 7]. При развитии гонартроза часто возникает варусная деформация, которая влечет за собой перераспределение биомеханической

нагрузки на суставные поверхности с ее увеличением на хрящевую ткань в области медиального мыщелка большой берцовой кости. В результате в коленном суставе возникают зоны с разной степенью дегенерации хрящевой ткани. По степени биомеханической нагрузки, соответствующей степени дегенерации хряща, их условно можно назвать ненагружаемая (задний край внутреннего мыщелка бедра), малонагружаемая (латеральный мыщелок большой берцовой кости) и нагружаемая зоны – наиболее измененный хрящ (соответствует медиальному мыщелку большой берцовой кости) [5, 4].

Способности гиалинового хряща к регенерации весьма ограничены и поиск методов восстановления суставных поверхностей является актуальной и нерешенной задачей [1, 3]. В последнее десятилетие активно разрабатываются клеточные методы восстановления гиалинового хряща, в том числе, аутологичная трансплантация хондроцитов (ХЦ) [1]. В качестве источника ХЦ может быть использован суставной хрящ ненагружаемой зоны. В литературе представлен ряд применяемых клеточных продуктов на основе аутологичных ХЦ ненагружаемого суставного хряща, полученных методом артроскопии [1,8,9]. Для замещения хрящевого дефекта, нужно достаточное количество ХЦ, сохранивших свой хондрогенный фенотип, способных выжить в среде сустава, пораженного патологическим процессом. При этом для формирования гиалинового хряща в области дефекта хрящевой ткани трансплантированные клетки должны синтезировать необходимое количество ключевых компонентов внеклеточного матрикса, таких как коллаген II типа и агрекан [1], с тем, чтобы откладываемый ими внеклеточный матрикс обладал физико-химическими свойствами близкими нативному гиалиновому хрящу [3]. Показано, что ХЦ больных гонартрозом, выделенные из зон коленного сустава с разной степенью дегенерации хряща имеют неодинаковый фенотип. Это проявляется в снижении экспрессии генов коллагена II типа, версикана и KLF<sub>4</sub> хондроцитами, выделенными из наиболее разрушенной зоны коленного сустава у больных гонартрозом – медиального мыщелка большой берцовой кости [4]. Также установлено, что в разных топографических зонах коленного сустава больных гонартрозом в зависимости от степени дегенерации хряща коллаген и протеогликаны существенно различаются по количеству, качеству, характеристикам связей с другими компонентами матрикса [6], что указывает на перестройку метаболизма хондроцитов под действием патологического процесса. Неясно, являются ли изменения метаболического фенотипа ХЦ необратимыми, а также не определено, каким образом влияет унификация условий функционирования в культуре на фенотипические черты клеток, полученных из разных зон коленного сустава, различающихся по степени дегенерации хряща.

**Цель исследования:** сравнительный анализ синтеза основных компонентов матрикса хряща – агрекана и коллагена II типа хондроцитами *in vitro*, выделенных из зон коленного

сустава, различающихся по степени дегенерации хрящевой ткани.

### **Материал и методы исследования**

Исследовали хрящевую ткань разных топографических зон коленного сустава больных посттравматическим гонартрозом III степени с варусной деформацией (5 пациентов в возрасте от 60 до 75 лет) после резекции сустава в ходе операции эндопротезирования. В группу исследования входили 2 мужчин и 3 женщины. У всех пациентов не было выявлено инфекционных, онкологических и психических заболеваний, врожденных и наследственных патологий, а так же сахарного диабета, остеопороза и других заболеваний провоспалительного характера. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на использование их биоматериала для научных исследований.

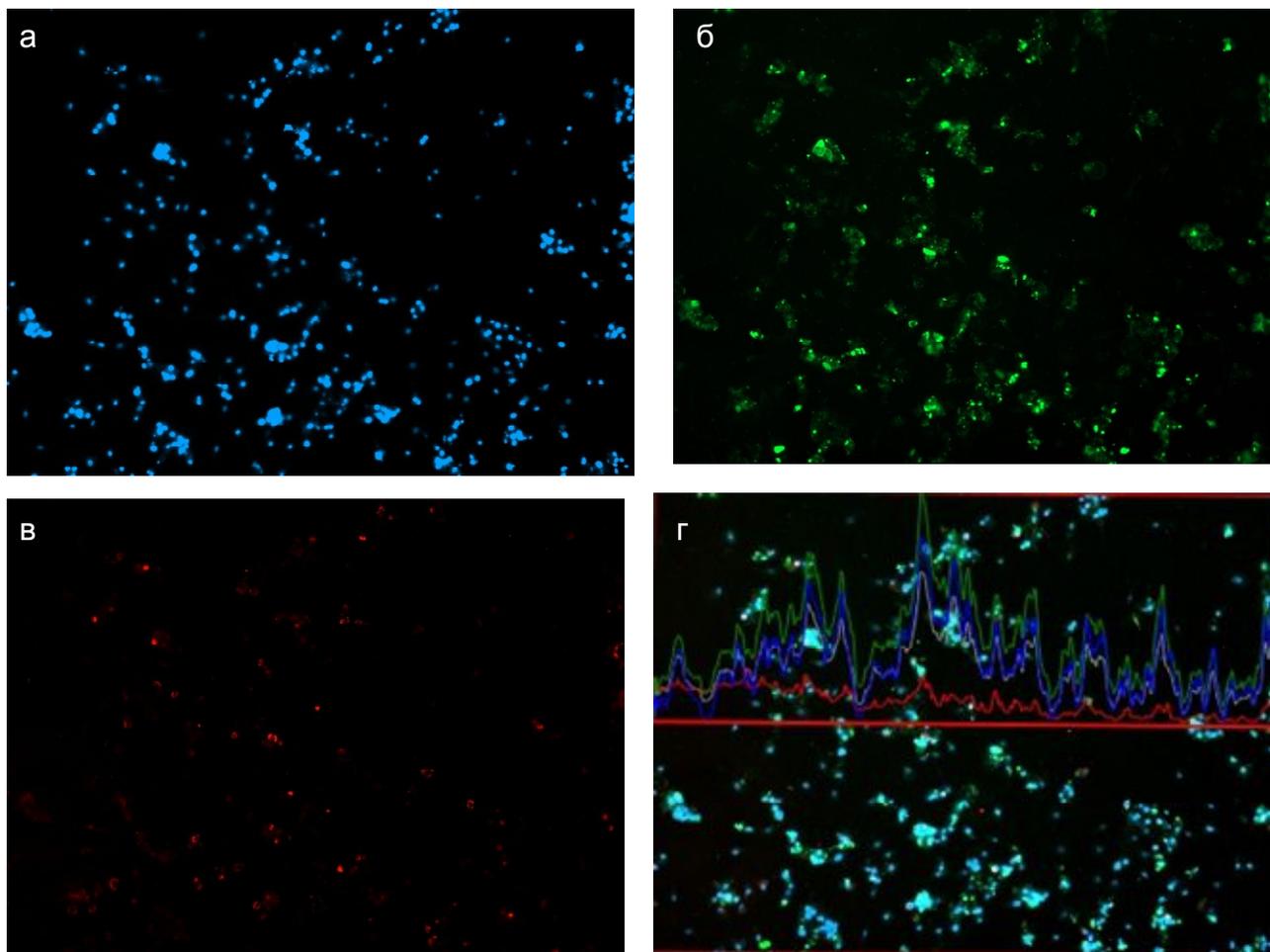
Измельченную и промытую 0,9% NaCl ткань лизировали 0,2% раствором коллагеназы II типа («Gibco», США) в течение 18 часов при 37°C. Выделенные клетки отмывали PBS и ресуспензировали в DMEM/F12 («Биолот», Россия), содержащей 15% FBS («Gibco», США) 42.19 ед./мл пенициллина, 0.042 мг/мл стрептомицина («Биолот», Россия), 0.053 мг/л амфотерицина В («Biowest», Франция) в конечных концентрациях. Клетки культивировали в 12-луночных планшетах («TPP», Швейцария) при 37°C, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, в концентрации 23 000 клеток на 1 см<sup>2</sup>.

Оценку синтеза коллагена II типа и агрекана ХЦ разных топографических зон производили методом иммуноцитохимии. Планшеты с клетками выводили из эксперимента на 7-е сутки культивирования. Клетки промывали PBS и фиксировали раствором 4% формалина в фосфатном буфере, через 10 мин. проводили пермебилилизацию мембран 4% раствором Triton X-100 (v/v) в 4% формалине (v/v). Затем препараты инкубировали в 1% растворе BSA (w/v) (Sigma, США) в течение 30 мин., после чего в течение 19 ч инкубировали с первичными поликлональными мышинными антителами к агрекану («Abcam», США) и кроличьими антителами к коллагену II типа («Abcam», США) [2]. Через 20 ч препараты промывали PBS и окрашивали вторичными мышинными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Invitogene, США) и кроличьими антителами – с Alexa Fluor 568 (Invitogene, США). ДНК маркировали DAPI. Наблюдение, съемку препаратов и оценку интенсивности свечения производили с помощью микроскопа Axio Observer Z1 («Zeiss», Германия) и программы ZEN Pro («Zeiss», Германия) при увеличении до 100 раз (10x) и с использованием фильтров DAPI, Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568. Наблюдение каждого препарата проводили в 5-ти полях зрения.

### **Результаты и обсуждение**

При визуальной оценке выявлено, что распределение (Рис. 1а) и интенсивность (Рис. 1 г) флуоресценции клеточных ядер в поле зрения (канал DAPI, голубой график)

неравномерны (Рис. 1а). Ядра ХЦ преимущественно образуют скопления, часть из которых настолько плотны, что отдельные ядра трудно дифференцировать. Участки высокой интенсивности свечения в канале DAPI совпадают с участками высокой интенсивности свечения агрекана в канале Alexa Fluor 488 (Рис. 1 б, г). Полученные данные указывают на то, что на 7-е сутки культивирования ХЦ формируют довольно крупные агрегаты, содержащие агрекан.



*Рис. 1. Синтез агрекана и коллагена 2 типа хондроцитами ненагружаемой зоны*

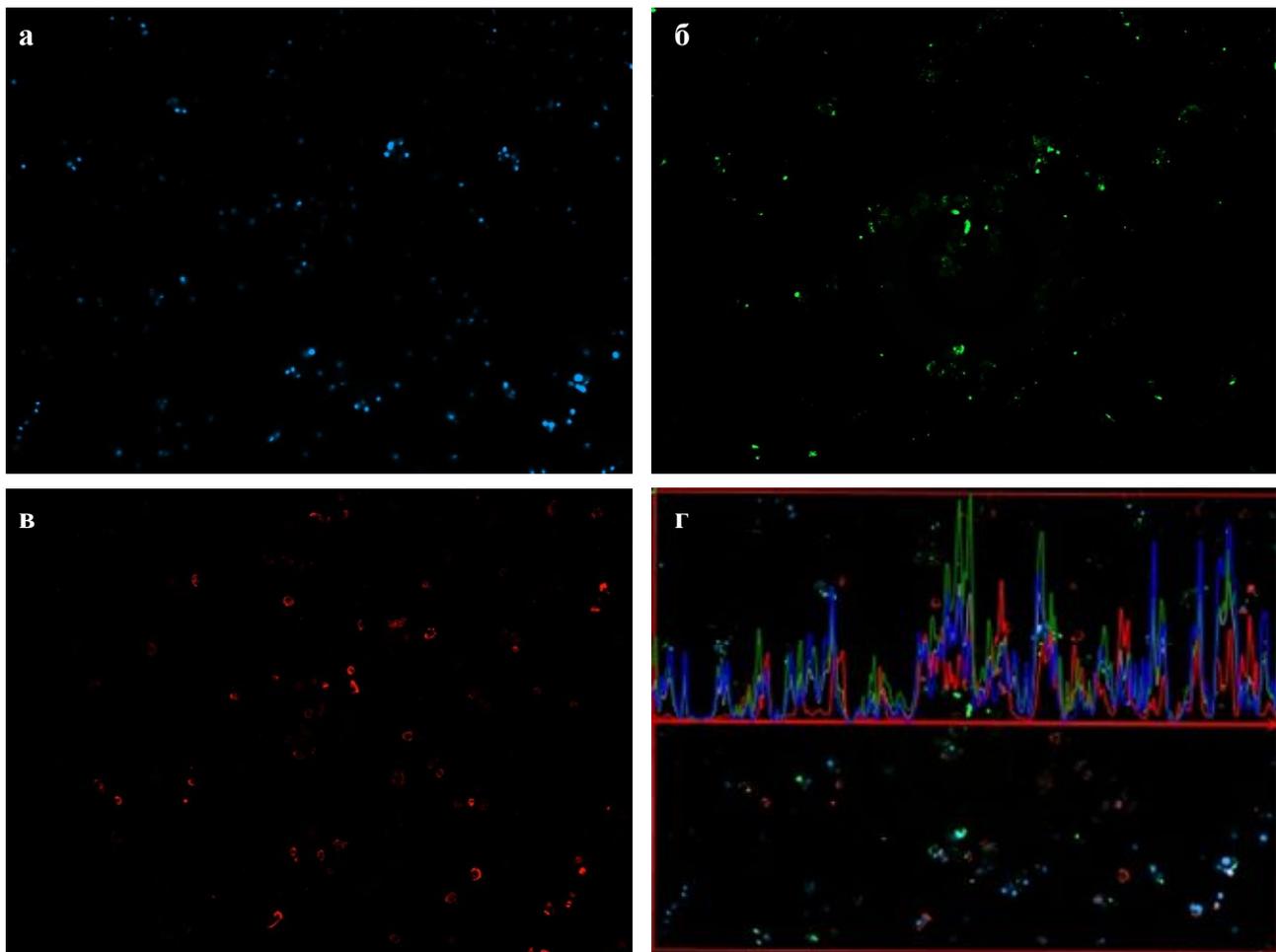
А – ядра хондроцитов, окрашенные флуоресцентным красителем DAPI  
Б – агрекан, синтезируемый хондроцитами, окрашенный Alexa Fluor 488;  
В – коллаген 2 типа, синтезируемый хондроцитами окрашенный Alexa Fluor 568;  
Г – График неравномерности интенсивности флуоресценции в трех каналах: DAPI, Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568

Флуоресценция коллагена II типа (красный график) менее интенсивна, по сравнению с флуоресценцией агрекана (зеленый график) (Рис. 1 г), участки отложения коллагена II типа не всегда совпадают с агрегатами клеток. В агрегатах клеток коллаген II типа располагается компактно, на поверхности клеточного агрегата. Данный белок хорошо визуализируется и рядом с клетками, ядра которых лежат одиночно (Рис. 1 в), при этом коллаген располагается под клеткой и/или вокруг клетки, но не на ее поверхности. Вокруг значительного большего

количества клеток отложения коллагена II типа не визуализируются (Рис. 1 в). Возможно, ХЦ не успели синтезировать необходимое для визуализации количество коллагена. С другой стороны, гиалиновый хрящ ненагружаемой зоны коленного сустава имеет относительно слабую коллагеновую сеть при большом содержании протеогликанов по сравнению с двумя другими исследуемыми зонами [6], поэтому не исключено, что у ХЦ из ненагружаемой зоны способность к сниженному синтезу коллагена II типа и более высокому синтезу агрекана детерминирована особенностями хрящевой ткани, из которой они были выделены.

Известно, что коллаген II типа и агрекан секретируют ХЦ преимущественно зоны изогенных групп клеток суставного хряща [3]. Возможно, отсутствие отложений коллагена II типа около части ХЦ из ненагружаемой зоны связано с присутствием в этой культуре клеток всех глубинных зон хряща: клеток поверхностной зоны, зоны колонковых структур и зоны гипертрофических клеток, которые отличаются по размерам, функциям и спектру экспрессируемых маркеров.

Клеточный покров в культуре ХЦ из малонагружаемой зоны (хрящ с латерального мыщелка большой берцовой кости) к 7-м суткам более редкий, по сравнению с культурой ХЦ из ненагружаемой зоны, в поле зрения наблюдаются участки, где интенсивность свечения близка к нулю (Рис. 2 а, г). Это свидетельствует о сниженной жизнеспособности и/или пролиферации клеток данной зоны в культуре [6]. Как и в случае ХЦ из ненагружаемой зоны, в культуре ХЦ из малонагружаемой зоны отмечается неравномерность распределения и интенсивности флуоресценции клеточных ядер, клетки собраны в агрегаты (Рис. 2 а), но менее плотные, чем в культуре клеток ненагружаемой зоны (Рис. 1).



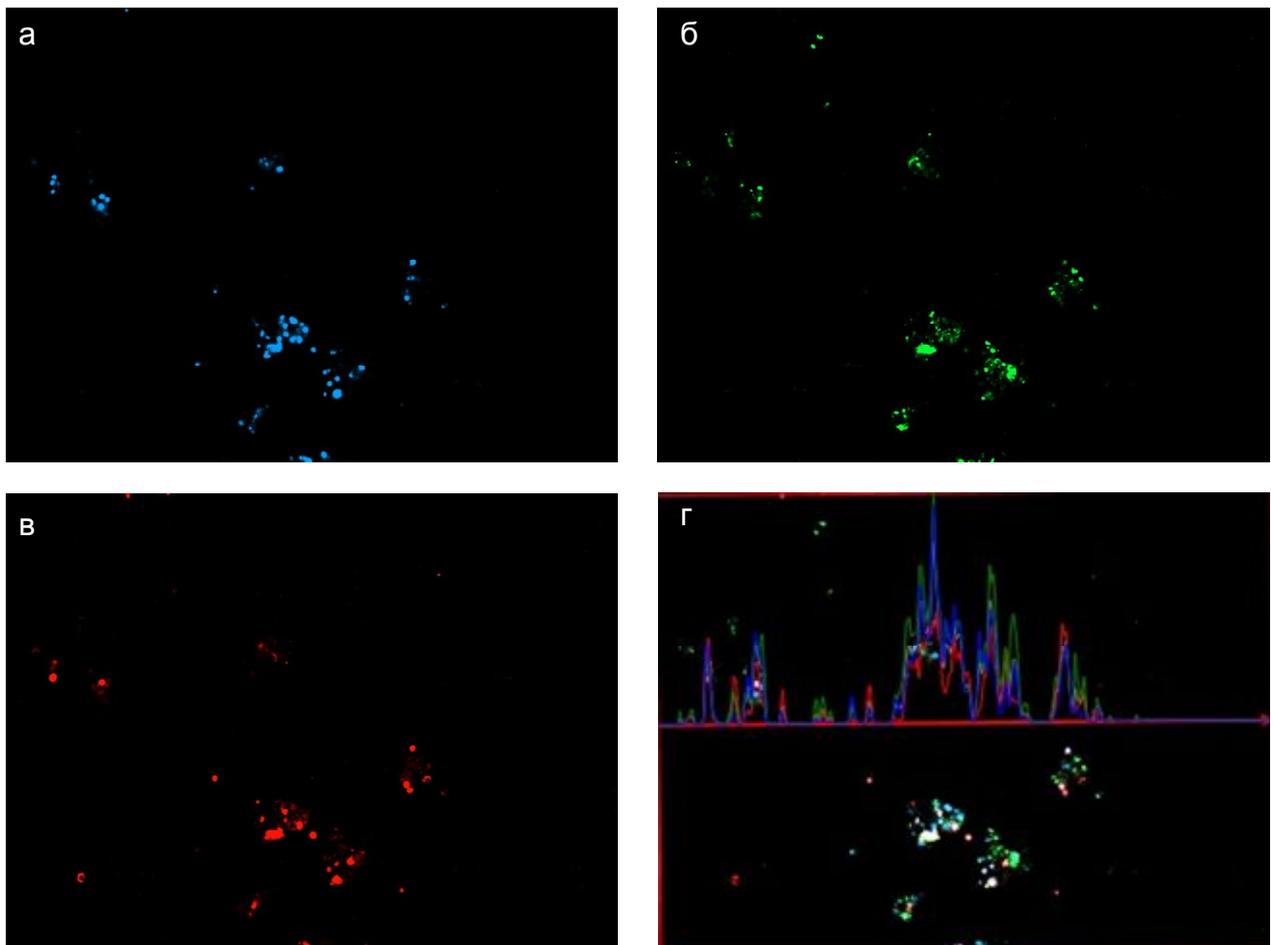
*Рис. 2. Синтез агрекана и коллагена 2 типа хондроцитами малонагружаемой зоны*

А – ядра хондроцитов, окрашенные флуоресцентным красителем DAPI  
 Б – агрекан, синтезируемый хондроцитами, окрашенный Alexa Fluor 488;  
 В – коллаген 2 типа, синтезируемый хондроцитами окрашенный Alexa Fluor 568;  
 Г – график интенсивности флуоресценции в трех каналах (DAPI, Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568.)

Отношение интенсивности свечения в канале Alexa Fluor 488 к интенсивности свечения в канале DAPI в культуре ХЦ из малонагружаемой зоны ниже, по сравнению с клетками из ненагружаемой зоны, что свидетельствует о сниженном количестве синтезируемого агрекана в пересчете на клетку (Рис. 2 г). В культуре клеток из этой топографической зоны агрекан визуализируется слабо в виде мелких агрегатов и точечных отложений (Рис. 2 б). Расположение агрегатов агрекана не всегда соответствует расположению клеточных ядер хондроцитов. Такой феномен можно объяснить несколькими причинами: возможно, что не все наблюдаемые клетки синтезируют агрекан в количестве, достаточном для визуализации, или клетки мигрируют с мест синтеза агрекана. Кроме того возможна локализация коллагена над поверхностью клеток, что маскирует свечение агрекана. Очевидно, ХЦ малонагружаемой зоны на 1-й неделе культивирования не способны к формированию крупных агрегатов, содержащих агрекан.

Коллаген II типа локализуется как в клеточных конгломератах, так и вокруг одиночно расположенных клеток, причем отложения коллагена в околоклеточной зоне обнаруживаются не у всех клеток. Коллаген II типа располагается преимущественно вокруг ядра в виде полукольца или подковы. В культуре присутствуют клетки, вокруг которых коллаген визуализируется точечно (Рис. 2 в). На графике интенсивности флуоресценции коллагена пики, отражающие характеристики расположения его в культуре, отличаются по высоте и ширине (Рис. 2 г) (красный график), что свидетельствует о разном количестве и площади отложений коллагена в культуре. В начале графика и на небольших участках поля зрения, интенсивность флуоресценции коллагена близка к нулю. Часто пики коллагена не совпадают с пиками агрекана, что, возможно, связано со специализацией синтеза молекул внеклеточного матрикса клетками в процессе культивирования, а также с низкой плотностью культуры клеток малонагружаемой зоны к данному сроку культивирования.

Культура ХЦ из нагружаемой зоны коленного сустава к 7-м суткам культивирования отличается пониженным количеством клеток по сравнению с культурами клеток, полученных из других зон. Судя по свечению в канале DAPI, клетки собраны в менее плотные конгломераты, по сравнению с ХЦ из ненагружаемой зоны, и в более плотные – по сравнению с малонагружаемой зоной (Рис. 3 а). Агрекан (Рис. 3 б) и коллаген II типа располагается вблизи групп клеточных ядер. На графике интенсивности флуоресценции (Рис. 3 г) видно, что кривые флуоресценции агрекана (зеленый), коллагена II типа (красный) и DAPI (голубой) коррелируют, пики интенсивности свечения практически совпадают по частоте, чего не наблюдалось в культуре ХЦ из других зон.



*Рис. 3. Синтез агрекана и коллагена 2 типа хондроцитами нагружаемой зоны*

А – ядра хондроцитов, окрашенные флуоресцентным красителем DAPI  
 Б – агрекан, синтезируемый хондроцитами, окрашенный Alexa Fluor 488;  
 В – коллаген 2 типа, синтезируемый хондроцитами окрашенный Alexa Fluor 568;  
 Г – График неравномерности интенсивности флуоресценции в трех каналах (DAPI, Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568.)

Таким образом, судя по характеристикам культуры, ХЦ, полученные из нагружаемой зоны коленного сустава, менее различаются по фенотипу, чем ХЦ из других зон. Возможно, это связано с отсутствием и/или сокращением в культуре популяций ХЦ из поверхностной и средней зоны хряща, поскольку хрящ в области медиального мыщелка бедренной кости является наиболее поврежденным, без признаков деления на зоны. Не исключено, что это может быть следствием низкой пролиферативной и миграционной активности клеток.

Известно, что у ХЦ процессы биосинтеза коллагена и протеогликанов происходят в противофазе. Когда энергетический заряд клетки высок, внутри ХЦ преобладают УТР-гексозы – предшественники протеогликанов, в то время как при пониженном энергетическом заряде в ХЦ обнаруживается увеличение концентрации предшественников коллагена – пролина, глицина [10]. Снижение энергетического заряда клетки происходит и вследствие митоза [10]. Принимая эти факты во внимание, можно предположить, что ХЦ, полученные из

разных зон коленного сустава, по каким-то причинам отличаются возможностью восстановления энергетического заряда клетки. Так, ХЦ из самой сохраненной зоны обладали наибольшей пролиферативной активностью и наибольшей способностью синтезировать агрекан, что свидетельствует об успешном восстановлении энергетического заряда ХЦ после цикла деления. В культурах клеток из более поврежденных зон коленного сустава при снижении отношения интенсивности флуоресценции агрекан/коллаген одновременно наблюдали пониженное количество клеток в культуре. В обеспечении клеток энергией основную роль играют два метаболических пути – дыхание и гликолиз. Определение вклада каждого пути в обеспечение культивируемых ХЦ энергией может способствовать выяснению механизмов, приводящих к различию фенотипов ХЦ из разных топографических зон коленного сустава больных гонартрозом, а также обеспечить наиболее благоприятные условия культивирования данных клеток с точки зрения пролиферации и синтеза компонентов внеклеточного матрикса.

### **Заключение**

Исследованы синтетические особенности ХЦ, культивированных в течение 7-ми суток, полученных из зон коленного сустава, различающихся по степени дегенерации хряща у больных гонартрозом. Показано, что пролиферативная активность ХЦ в культуре падает в зависимости от выраженности дегенерации хрящевой ткани, из которой они были выделены, от ненагружаемой к нагружаемой зоне.

Показано, что агрекан и коллаген II типа синтезируются хондроцитами всех зон, но в разном количестве. Наибольший потенциал к синтезу агрекана на данном этапе культивирования имеют клетки ненагружаемой зоны. Высокая интенсивность флуоресценции и наличие агрегатов в культуре клеток свидетельствует о сохранении метаболической активности хондроцитами этой зоны по сравнению с другими. Сниженная способность к синтезу агрекана клетками малонагружаемой и нагружаемой зон может быть следствием изменений метаболизма клеток в процессе развития патологического процесса в суставном хряще.

При визуальной оценке синтеза коллагена II типа ХЦ из разных зон коленного сустава, различающихся по степени дегенерации хрящевой ткани, показано, что наиболее интенсивно данный белок синтезируют хондроциты нагружаемой и малонагружаемой зон.

*Работа выполнена на средства гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых №МК-6370.2015.7*

### **Список литературы**

1. Божокин М.С., Божкова С.А., Нетылько Г.И. Возможности современных клеточных технологий для восстановления поврежденного суставного хряща // Травматология и ортопедия России. – 2016. – №22 (3). – С.122- 134.
2. Изменения экспрессии mп-супероксиддисмутазы в гиппокампекрыс под влиянием одно- и трёхкратной умеренной гипобарической гипоксии / С.А. Строев, Е.И. Тюлькова, М.О. Самойлов, М.Т. Пелто-Хьюкко // Морфология. – 2011. – С. 7-12.
3. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении дефектов суставной поверхности / Н.Н. Советников, В.А. Кальсин, М.А. Конопляников, В.В. Муханов // Клиническая практика. – 2013. – №1. – С. 52-66.
4. Особенности метаболизма протеогликанов из разных топографических зон коленного сустава у больных остеоартрозом: вариабельность фенотипа хондроцитов / Т.В. Русова, Е.Л. Строкова, А.А. Воропаева, Е.И. Щелкунова // Сибирский научный медицинский журнал. – Т. 33, №5. – 2013. – С. 78-86.
5. Русова Т.В., Байтов В.С. Структура гликозаминогликанов суставного хряща у больных остеоартрозом: влияние топографии коленного сустава // Сибирский научный медицинский журнал. – Т. 32, №2. – 2012. – С. 54-60.
6. Структурно-функциональные особенности хрящевой ткани коленного сустава при остеоартрозе / Т.В. Русова, А.А. Воропаева, А.В. Корель, Е.И. Щелкунова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №5. – С. 337.
7. Anderson A.S., Loeser R.F. Why is osteoarthritis an age-related disease? // Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol. – 2010. – Vol. 24, No 1. – P. 15–25.
8. In vitro human chondrocyte culture; A modified protocol Middle-East / M. Heidari, M. Tahmasebi, S. Etemad et al. // J. Scient. Res. – 2011. – Vol. 9 (1). – P. 102-109.
9. Mid-term results of autologus matrix-induced chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee. / J. Gille, E. Schuseil, J. Wimmer et al. // Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. – 2010. – Vol. 18 (11). – P. 1456-1465.
10. Kwon H.J., Ohmiya Y. Metabolomic analysis of differential changes in metabolites during ATP oscillations in chondrogenesis // Biomed. Res. Int.– 2013. Article ID 213972, 8 p.