

Современные возможности патогенетической терапии остеоартрита на молекулярно-клеточном уровне

Д.м.н. И.Б. Беляева, акад. РАН В.И. Мазуров

ФГБОУ ВО «Северо-Западный ГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

РЕЗЮМЕ

Остеоартрит (ОА) относится к наиболее распространенным заболеваниям суставов, являющимся одной из ведущих причин нетрудоспособности. За последнее время достигнут значительный прогресс в изучении патогенеза ОА, однако многие вопросы до сих пор остаются нерешенными. В прогрессировании ОА значительную роль играет увеличение продукции провоспалительных цитокинов, которые индуцируют экспрессию матриксных металлопротеиназ (ММП) и эйкозаноидов, способных вызывать повреждение суставного хряща и пролиферацию синовиальных клеток. В обзоре представлены результаты исследований *in vitro*, посвященных влиянию препарата Алфлутон на некоторые патогенетические звенья ОА с использованием в качестве экспериментальной модели клеток CHON-001 (хондроциты хрящевой кости человека), а также клеток, выделенных из хряща кролика. Установлены генетические, клеточные и молекулярные механизмы действия препарата Алфлутон, реализующиеся в стимуляции пролиферации хондроцитов, активации синтеза внеклеточного матрикса посредством модуляции трансформирующего фактора роста β , ингибировании гиалуронидазы, окислительного стресса и активности внеклеточной экспрессии генов провоспалительных цитокинов (интерлейкина (ИЛ) -6, ИЛ-8 и ИЛ-1 β) (*in vitro*), что обуславливает как симптом-модифицирующее, так и структурно-модифицирующее действие препарата при ОА.

Ключевые слова: остеоартрит, регенерация хондроцитов, суставной хрящ, провоспалительные цитокины, Алфлутон.

Для цитирования: Беляева И.Б., Мазуров В.И. Современные возможности патогенетической терапии остеоартрита на молекулярно-клеточном уровне // РМЖ. МЕДИЦИНСКОЕ ОБОЗРЕНИЕ. 2017. № 1. С. 26–30.

ABSTRACT

Modern possibilities of pathogenetic therapy of osteoarthritis at the molecular-cellular level

Belyaeva I.B., Mazurov V.I.

North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease, which is one of the main causes of disability. Significant progress has been made recently in studying the pathogenesis of OA, but many questions remain unsolved. In the progression of OA a significant role is played by an increase in the production of pro-inflammatory cytokines, which induce the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and eicosanoids, which can cause articular cartilage damage and the proliferation of synovial cells. The review presents the results of *in vitro* studies of the effect of Alflutop on certain pathogenetic links of OA using as an experimental model the CHON-001 cells (human bone cartilage chondrocytes) and the cells of a rabbit cartilage. The genetic, cellular and molecular mechanisms of the Alflutop action stimulate the proliferation of chondrocytes, activate the synthesis of extracellular matrix by modulating the transforming growth factor- β , inhibiting hyaluronidase, oxidative stress, and extracellular expression of the genes of pro-inflammatory cytokines (interleukin (IL) 6, IL8 and IL1 β) (*in vitro*), which determines both the symptom-modifying and the structural-modifying effect of the drug in OA.

Key words: osteoarthritis, chondrocyte regeneration, articular cartilage, pro-inflammatory cytokines, Alflutop.

For citation: Belyaeva I.B., Mazurov V.I. Modern possibilities of pathogenetic therapy of osteoarthritis at the molecular-cellular level // RMJ. MEDICAL REVIEW. 2017. № 1. P. 26–30.

Введение

Остеоартрит (ОА) – хроническое гетерогенное прогрессирующее заболевание суставов, характеризующееся деградацией экстрацеллюлярного матрикса хряща, которое сопровождается ремоделированием тканей сустава и проявляется болевым синдромом, развитием краевых остеофитов с нарушением функциональной активности и снижением качества жизни больных [1]. ОА относится к наиболее распространенным заболеваниям суставов, встречается у 12–15% людей в популяции и является одной из ведущих причин нетрудоспособности [1]. К факторам риска развития ОА относятся: женский пол, дефицит эстрогенов в постменопаузе, врожденные заболевания костей и суста-

вов, избыточная масса тела, повышенные физические нагрузки, травмы суставов и др. [2–4].

Патогенез ОА

За последние десятилетия достигнут значительный прогресс в изучении этиопатогенеза ОА, однако многие вопросы до сих пор остаются спорными. Если первоначально приоритет в развитии ОА отдавался поражению суставного хряща в рамках дегенеративно-дистрофического процесса, а метаболические нарушения в субхондральной кости (СХК) рассматривались как вторичный процесс, то в последнее время СХК отводится ведущая роль в инициации и прогрессировании данного заболе-

вания [1, 2]. В целом ряде исследований было показано, что метаболические нарушения в СХК напрямую связаны с процессом ее ремоделирования, что сопровождается увеличением толщины субхондральной пластины, склерозом, уменьшением минерализации костного матрикса, повышением образования остеофитов, развитием костных кист и распространением отека, связанного с сосудистой инвазией кальцинированного хряща [1, 5–7]. Эти нарушения вызывают повреждения смежных суставных поверхностей, нарушение конгруэнтности сустава и, следовательно, прогрессирование ОА. Основную роль в этом играют остеобласты и остеокласты. Центральное место среди многих факторов, стимулирующих чрезмерную активность остеокластов, занимают представители семейства фактора некроза опухоли (ФНО) [3]. Ключевая роль в поддержании равновесия между анаболическими и катаболическими процессами в хряще отводится хондроцитам [5].

Роль провоспалительных цитокинов в патогенезе ОА

В прогрессировании ОА значительную роль играет увеличение продукции провоспалительных цитокинов, которые индуцируют экспрессию матриксных металлопротеиназ (ММП) и эйкозаноидов, способных вызывать угнетение синтеза коллагена и протеогликанов и повреждение суставного хряща, а также способствующих пролиферации синовиальных клеток. Основными провоспалительными цитокинами считаются интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β), фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), онкостатин М (ОСМ), интерлейкин-6 (ИЛ-6), интерлейкин-8 (ИЛ-8), интерлейкин-17 (ИЛ-17) и интерлейкин-18 (ИЛ-18), оксид азота (NO), реактивные формы кислорода (ROS), простагландины (ПГ) и лейкотриены (ЛТ) [3, 8–11].

Повреждение суставного хряща и СХК может привести к воспалению синовиальной оболочки, вызывая, в свою очередь, дальнейшее повышение продукции провоспалительных цитокинов, ММП и агреганазы, которые ускоряют деградацию хряща [1]. Высвобождение этих медиаторов воспаления, а также формирование остеофитов стимулируют ноцицепторы синовиальной оболочки, вызывая боль. Продукты деградации хряща, стимулируя выработку провоспалительных агентов, могут индуцировать аутоиммунный ответ организма. Кроме того, провоспалительные цитокины совместно с NO и ROS вызывают апоптоз как хондроцитов, так и эндотелиоцитов, активируя свертывающую систему крови и приводя к образованию микротромбов в сосудистом русле СХК [1].

Дальнейший активный процесс ремоделирования СХК приводит к неизбежной сосудистой инвазии глубоких

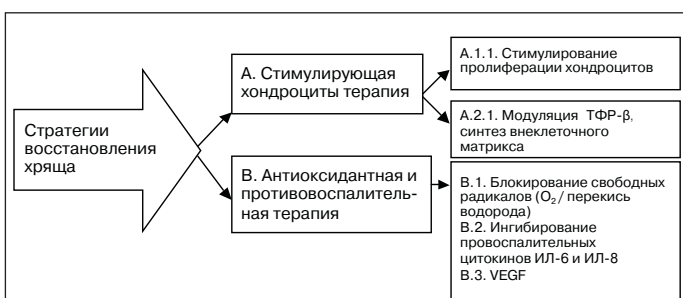


Рис. 1. Терапевтические эффекты препарата Алфлутоп (*in vitro* скрининг) при ОА

слоев хрящевой ткани благодаря активному синтезу эндотелиального фактора сосудистого роста (VEGF) — сигнальному белку, вырабатываемому клетками для стимулирования васкулогенеза.

Значимую роль в прогрессировании ОА играет трансформирующий фактор роста (ТФР- β) [3, 12]. ТФР- β обладает плеiotропностью свойств: с одной стороны, модулятор иммунной системы, регулятор роста клеток и их дифференцировки, с другой — хемотаксический фактор, мощный стимулятор пролиферации фибробластов, усиливает продукцию ММП, а также участвует в костном ремоделировании за счет инициации синтеза матриксных белков и их минерализации.

Установлено, что реактивные формы кислорода (супероксид-анион), образующиеся в процессе воспаления, способны оказывать деструктивное действие на клеточные



Рис. 2. Динамика клеточного цикла хондроцитов линии клеток CHON-001, модулированная препаратом Алфлутоп (эффект препарата Алфлутоп на долю клеток в репликационной (S) и митотической (G2/M) фазах клеточного цикла)



Рис. 3. Последовательность генерации пролиферации хондроцитов после обработки Алфлутопом и в контроле, оцениваемая с помощью индекса пролиферации



Рис. 4. Внеклеточное высвобождение ТФР- β в линии клеток CHON-001, обработанных препаратом Алфлутоп

мембраны. Помимо цитотоксических эффектов они способны индуцировать клеточный синтез ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-8.

Лечение ОА

Согласно современным рекомендациям, лечение ОА включает применение нефармакологических, лекарственных, а при необходимости и хирургических методов.

Среди фармакологических методов лечения основное место занимают симптоматические препараты немедленного действия (анальгетики, опиоиды, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП)) и препараты замедленного действия (SYSADOA – Symptomatic slow-active drug in osteoarthritis), структурно модифицирующие хрящ. Баланс применения этих классов препаратов сегодня обеспечивает эффективное лечение больных ОА [8, 13–20].

В группу SYSADOA входит препарат Алфлутоп. Алфлутоп является оригинальным биотехнологическим препаратом, в состав которого входят глюкозаминогликаны (хондроитин-4 сульфат, хондроитин-6 сульфат, дерматансульфат, кератансульфат), глюкуроновая кислота, глицерофосфолипидные соединения, миоинозитолфосфаты, аминокислоты и соли Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn.

Экспериментальные исследования препарата Алфлутоп

Экспериментальные исследования, проведенные *in vitro*, позволили идентифицировать мишени для препарата Алфлутоп [21, 22]. В исследовании материалом для изучения явилась клеточная линия человеческих хондроцитов



Рис. 5. Ферментативная активность гиалуронидазы в присутствии препарата Алфлутоп и глицирризиновой кислоты

Концентрация супероксида в хондроцитах линии CHON-001, стимулированных с помощью ФНО- α + ФМА

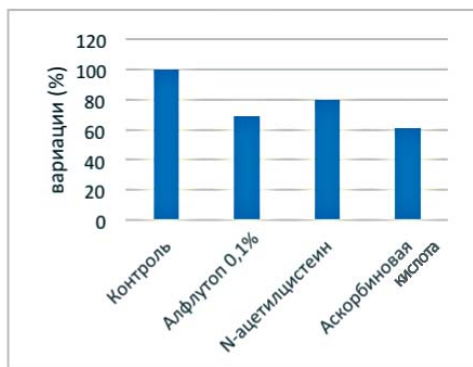
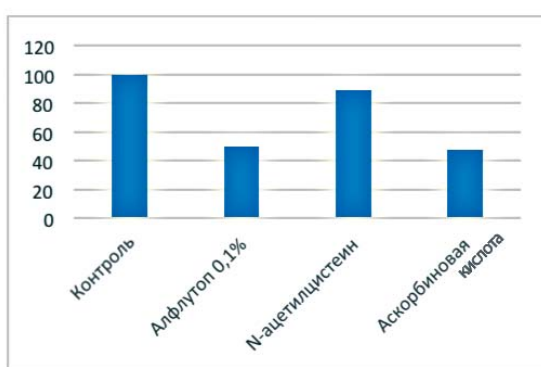


Рис. 6. Концентрация ROS (перекись водорода и супероксид анион) в хондроцитах человека – CHON-001, стимулированных с помощью ФНО- α + ФМА и обработанных препаратом Алфлутоп, аскорбиновой кислотой и N-ацетилцистеином

Концентрация пероксида в хондроцитах линии CHON-001, стимулированных с помощью ФНО- α + ФМА



CHON-001, подвергаясь воздействию провоспалительных стимулов и затем обработанная 0,1% и 0,2% раствором препарата Алфлутоп [21, 23]. Терапевтические мишени ОА, изучаемые при разработке препарата Алфлутоп, представлены на рисунке 1.

Влияние препарата Алфлутоп на стимулирование пролиферации хондроцитов

Л. Олариу и соавт. [21, 24–26] изучали пролиферативный статус хондроцитов после их обработки препаратом Алфлутоп (0,1 и 0,2% раствором) путем определения скорости митоза и последовательности генерации пролиферации с оценкой пролиферативного индекса (ПИ) и распределения фаз клеточного цикла в фазе S (синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)) и G2/M (начало митоза). Оценивался общий процент клеток в стадии синтеза ДНК и митоза (%S + %G2/M), которые являются показателем ПИ хондробластов. Исследования показали, что после обработки хондроцитов препаратом Алфлутоп значительно увеличивается процент клеток в фазе репликации (S) и в фазе митоза (G2/M) клеточного цикла (рис. 2). Кроме того, Алфлутоп значительно увеличивает ПИ хондробластов (рис. 3), повышая его на 53% (для концентрации Алфлутопа 0,1%) и на 64% (для концентрации Алфлутопа 0,2%) по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о восстановлении количества и функциональной активности хондроцитов после их обработки препаратом Алфлутоп.

Влияние препарата Алфлутоп на синтез внеклеточного матрикса посредством модуляции ТФР- β

Результаты проведенных исследований показали, что обработка хондроцитов препаратом Алфлутоп в сравнении с контролем приводила к увеличению активации внеклеточного высвобождения ТФР- β на 7% (рис. 4) [24, 25]. Эти данные свидетельствуют о том, что препарат Алфлутоп может регулировать гомеостаз внеклеточного матрикса посредством восстановления баланса анаболических и катаболических процессов. Известно, что высокий пул этого сигнального белка может привести к аномальной оссификации.

Влияние препарата Алфлутоп на стабилизацию внеклеточного матрикса посредством ингибирования гиалуронидазы

Ферментативная активность гиалуронидазы во внеклеточном матриксе хрящевой ткани определялась после ее обработки препаратом Алфлутоп или глицирризиновой

кислотой, являющейся мощным ингибитором гиалуронидазы. Алфлутоп продемонстрировал ингибирование ферментативной активности гиалуронидазы на 83% (рис. 5). Эти факты обосновывают патогенетическое влияние препарата Алфлутоп на стабилизацию внеклеточного матрикса при ОА [25, 26].

Оценка антиоксидантной активности препарата Алфлутоп

Доказательства биологической активности Алфлутопа демонстрируют результаты исследований по

оценке его влияния на окислительный стресс, в частности на активные формы кислорода [21, 25, 26]. Известно, что супероксид-анион имеет прямое деструктивное воздействие на клеточные мембраны. Помимо прямых цитотоксических эффектов супероксид-анион действует опосредованно благодаря способности индуцировать клеточный синтез таких цитокинов, как ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-8.

Так, в исследовании хондроциты человека из клеточной линии CHON-001 стимулировали в течение 24 ч с помощью ФНО- α в концентрации 15 нг/мл и форболмиристацетатом (ФМА) в концентрации 0,1 мкМ. Действие препарата Алфлутоп сравнивали с действием N-ацетилци-

стеина в концентрации 5 мМ и аскорбиновой кислоты в концентрации 45 мкМ – двух хорошо известных антиоксидантов. Было установлено, что Алфлутоп индуцирует ингибирование обеих активных форм кислорода. Уровень внутриклеточной перекиси водорода снижается в присутствии препарата Алфлутоп на 52%, на 11% для N-ацетилцистеина и на 62% для аскорбиновой кислоты. Препарат Алфлутоп снижает содержание внутриклеточного супероксид-аниона на 32%, N-ацетилцистеин – на 20% и аскорбиновая кислота – на 39% (рис. 6).

Влияние препарата Алфлутоп на ингибирование активности генов провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 и

проангиогенного фактора роста эндотелия сосудов (VEGF)

В недавно проведенных исследованиях были установлены молекулярные эффекты препарата Алфлутоп, заключающиеся в стимуляции противовоспалительных и антиангиогенных сигнальных путей, блокирующих активность генов провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8) и проангиогенного фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [21, 26].

Для создания экспериментальной модели воспаления *in vitro* и демонстрации молекулярных эффектов препарата Алфлутоп была выбрана стандартизированная клеточная линия хондроцитов CHON-001, стимулированная ФНО- α , ФМА и ИЛ-1 β . Проводился контроль фенотипа и внеклеточной экспрессии генов ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1 β в хондроцитах, обработанных препаратом Алфлутоп, после их стимуляции и в контроле (нестимулированные клетки) методом проточной цитометрии с использованием мультиплексных микросфер и количественной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с детекцией в реальном времени (табл. 1).

Результаты проведенных исследований позволили установить, что Алфлутоп снижает высвобождение ИЛ-6 в человеческих хондроцитах, стимулированных с помо-

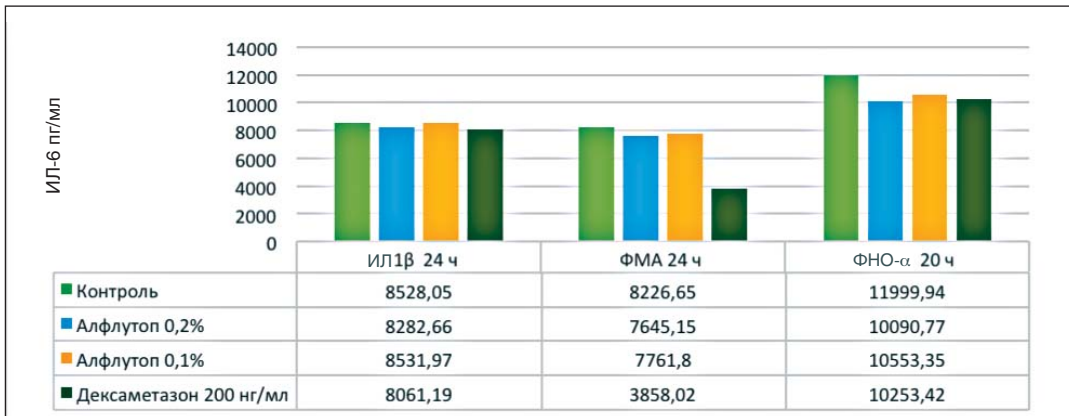


Рис. 7. Влияние препарата Алфлутоп на внеклеточное высвобождение ИЛ-6 в стимулированных хондроцитах (линия клеток CHON-001)

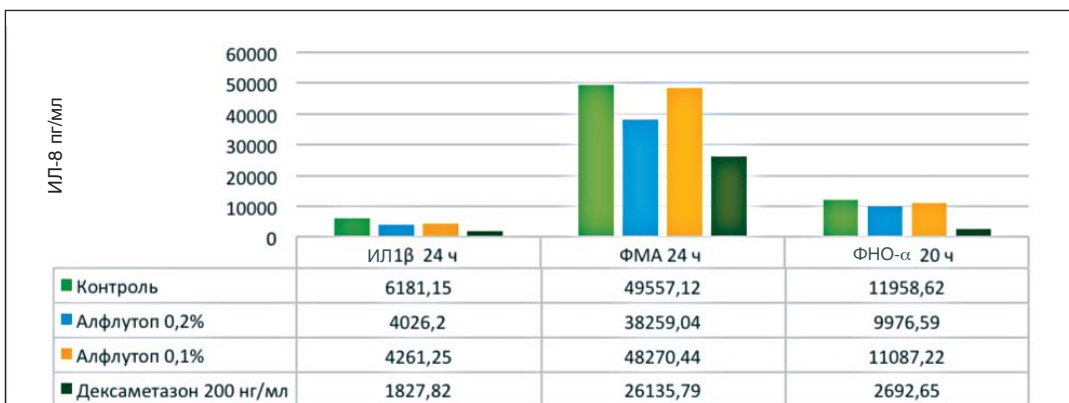


Рис. 8. Влияние препарата Алфлутоп на внеклеточное высвобождение ИЛ-8 в стимулированных хондроцитах (линия клеток CHON-001)

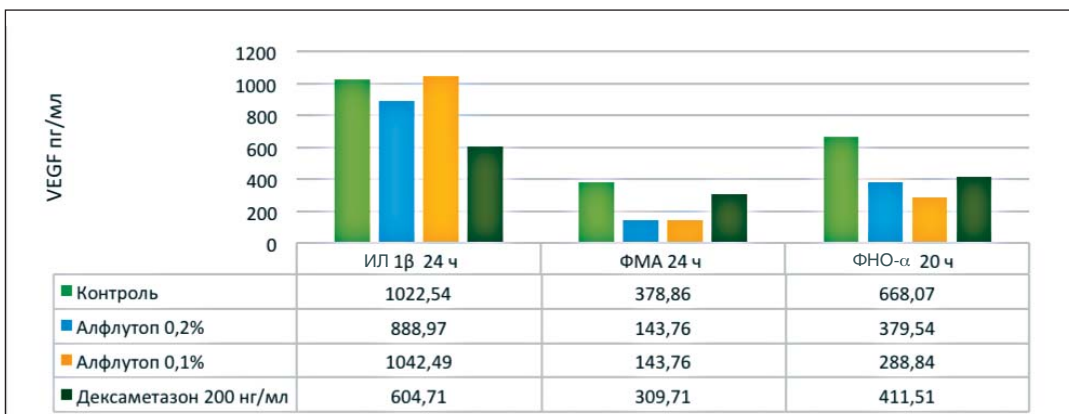


Рис. 9. Влияние препарата Алфлутоп на внеклеточное высвобождение VEGF в стимулированных хондроцитах (линия клеток CHON-001)

Таблица 1. Молекулярные эффекты препарата Алфлутоп. Экспериментальные версии, стимуляционные агенты и ответ на клетках линии CHON-001

№ экспериментальных версий	Стимулы	Продолжительность стимуляции	Доза стимулов	Ответ клеток линии CHON-001
1	ИЛ-1 β	24 ч	10 нг/мл	Стимулирует высвобождение ИЛ-6; уровень ИЛ-8 во внеклеточной жидкости увеличивается; уровень VEGF остается неизменным
2	ИЛ-1 β	72 ч	10 нг/мл	Стимулирует высвобождение VEGF; уровни ИЛ-6 и ИЛ-8 во внеклеточной жидкости снижаются
3	ФНО- α	20 ч	20 нг/мл	Стимулирует высвобождение ИЛ-6 и ИЛ-8; уровень VEGF остается неизменным
4	ФМА	24 ч	1 мкМ	Стимулирует высвобождение ИЛ-6, ИЛ-8 и VEGF

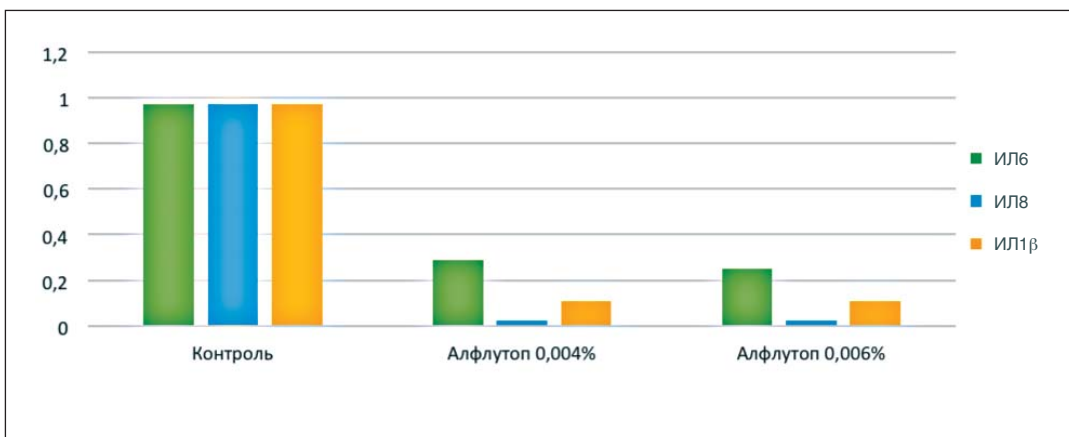


Рис. 10. Влияние препарата Алфлутоп на гены ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-1 с избыточной экспрессией в хондроцитах (линия клеток CHON-001), стимулированных провоспалительным стимулом ФНО- α .

стью ИЛ-1 β *in vitro* (рис. 7) [25]. Отмечено ингибирующее влияние Алфлутопа на внеклеточное высвобождение ИЛ-6 и ИЛ-8 из хондроцитов человека после их стимуляции с помощью ФНО- α (рис. 8). Алфлутоп значительно снижал уровень внеклеточного VEGF (рис. 9), что предполагает его влияние на снижение активности VEGF-опосредованных деструктивных процессов: стимуляции MMP и деградации матричного белка. Напротив, дексаметазон, обладающий мощным противовоспалительным действием, не продемонстрировал такого же сильного, как у препарата Алфлутоп, снижения высвобождения VEGF при стимуляции хондроцитов ФМА и ФНО- α .

Важно отметить, что обработка хондроцитов препаратом Алфлутоп по сравнению с контролем после стимуляции ФНО- α способствовала снижению экспрессии генов ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-1 β (рис. 10).

Заключение

Анализ полученных данных позволил установить, что противовоспалительный эффект *in vitro*, индуцированный препаратом Алфлутоп, осуществляется через инициацию механизмов, участвующих в подавлении активности генов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8. Этот факт определяет антицитокиновый эффект Алфлутопа, который реализуется на генетическом и фенотипическом уровнях [3, 24, 25]. Кроме того, установлена способность Алфлутопа ингибировать активность VEGF, иницирующего ангиогенез и деструктивные процессы при ОА.

Таким образом, многоплановая биологическая активность Алфлутопа на молекулярном, генетическом и клеточном уровнях, заключающаяся в стимулировании пролиферации хондроцитов, активации синтеза внеклеточного матрикса посредством модуляции ТФР- β , ингибирования

нии гиалуронидазы и снижении окислительного стресса, а также антицитокиновая активность, реализующаяся в снижении экспрессии генов ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-1 β , способствуют как симптом-модифицирующему, так и структурно-модифицирующему действию, что было показано в многочисленных клинических исследованиях по изучению эффективности этого препарата у пациентов с

ОА и дегенеративно-дистрофическими заболеваниями позвоночника. Это дает основания для назначения Алфлутопа в качестве стартового препарата группы хондропротекторов в базисной терапии данных заболеваний.

В заключение отметим, что бесспорно высокий уровень научных исследований по влиянию препарата Алфлутоп на регенерацию хондроцитов на генетическом, клеточном и молекулярном уровнях был отмечен золотой медалью на 8-й Европейской выставке инноваций и изобретений (май 2016 г.).

Литература

1. Мазуров В.И., Трофимова А.С., Трофимов Е.А. Факторы риска и некоторые аспекты патогенеза остеоартрита // Вестник СЗГМУ им. И.И. Мечникова. 2016. № 2. С. 116–125 [Mazurov V.I., Trofimova A.S., Trofimov E.A. Faktory riska i nekotorye aspekty patogeneza osteoartrita // Vestnik SZGMU im. I.I. Mechnikova. 2016. № 2. S. 116–125 (in Russian)].
2. Лиля А.М. Остеоартрит. Ревматология. Фармакотерапия без ошибок: руководство для врачей / под ред. В.И. Мазурова. М.: Е-нот, 2017. С. 351–379 [Lila A.M. Osteoarthritis. Revmatologija. Farmakoterapija bez oshibok: rukovodstvo dlja vrachej / pod red. V.I. Mazurova. M.: E-noto, 2017. S. 351–379 (in Russian)].
3. Самойлов В.В., Миromanov А.М., Самойлова С.И. Значение цитокинов в патогенезе остеоартроза // Забайкальский медицинский вестник. 2014. № 2. С. 119–125 [Samojlov V.V., Miromanov A.M., Samojlova S.I. Znachenie citokinov v patogeneze osteoartritoza // Zabajkalskij medicinskij vestnik. 2014. № 2. S. 119–125 (in Russian)].
4. Felson D.T., Lawrence R.C., Dieppe P.A. et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors // Ann Intern Med. 2000. Vol. 133. P. 635–646.
5. Lane S.R., Trindade M.C., Ikenoue T. et al. Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism // Biorheology. 2000. Vol. 37(1-2). P. 95–107.
6. Sandell L.J., Aigner T. Articular cartilage and changes in Arthritis: Cell biology of osteoarthritis // Arthritis Research and Therapy. 2001. Vol. 3. P. 107.
7. Tallheden T., Bengtsson C., Brantsing C. et al. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients // Arthritis Research and Therapy. 2005. Vol. 7. P. R560.
8. Bruyere O., Cooper C., Pelletier J.P. et al. A consensus statement on the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) algorithm for the management of knee osteoarthritis – From evidence-based medicine to the real-life setting // Semin Arthritis Rheum. 2016. Vol. 45(4 Suppl). P. 3–11.

Полный список литературы Вы можете найти на сайте <http://www.rmj.ru>