

## ВОЗДЕЙСТВИЕ 1-34 ФРАГМЕНТА ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЕ ХОНДРОПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАЦИЮ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

А.Л. ТОРГОМЯН

Ереванский Государственный медицинский университет им М. Гераци, ул. Корюна, 2, Ереван, Армения  
E-mail: adelinatorgomyan@yahoo.com

*Целью настоящего исследования явилось изучение воздействия периодического и постоянного введения 1-34 фрагмента паратиреоидного гормона (ПТГ) на дифференциацию бычьих прехондробластов, содержащихся в хондрогенной и остеогенной средах. Кроме того, была исследована регенерация хрящевой ткани беспородных крыс и зависимость данного процесса от уровня паратиреоидного гормона, а также изменения субхондральной кости при этом. Были исследованы монослойные культуры бычьих хондропрогениторных клеток, содержащихся в остеогенной и хондрогенной средах с периодическим и постоянным добавлением 1-34 ПТГ, с последующим иммунофлуоресцентным анализом соответствующих маркеров. Также были оперированы коленные суставы с целью образования дефекта суставного хряща, с дальнейшим исследованием процессов регенерации в зависимости от введения ПТГ in vivo посредством гистохимического анализа оперированных коленных суставов у крыс. Полученные данные свидетельствуют о модулирующем влиянии ПТГ на хондрогенную дифференциацию стволовых клеток и терапевтическом потенциале данного гормона для восстановления хрящевой ткани.*

**Ключевые слова:** паратиреоидный гормон, хондроциты, стволовые клетки, дифференцирование

**Введение.** Предыдущими исследованиями было установлено, что периодическое введение 1-34 фрагмента паратиреоидного гормона (1-34 ПТГ) увеличивает массу, прочность и минеральную плотность костной ткани, а также улучшает костную микроархитектуру и заживление переломов [1, 2]. Кроме того, *in vitro* исследования показали, что периодическое повышение уровня 1-34 ПТГ усиливает пролиферацию и дифференцировку остеопрогениторных клеток (преостеобластов) в костном мозге, увеличивает активность остеобластов и ингибирует апоптоз остеобластов [3]. Однако молекулярный механизм, лежащий

в основе механизма воздействия 1-34 ПТГ во время остеогенной дифференцировки костных мезенхимальных стромальных клеток остается невыясненным.

Некоторые исследования указывают, что 1-34 ПТГ влияет и на хондроциты. При этом, 1-34 ПТГ ингибирует терминальную дифференцировку суставных хондроцитов и прогрессирование остеоартрита (ОА) [4]. Параллельно с подавлением гипертрофии хондроцитов 1-34 ПТГ стимулирует пролиферацию и дифференцировку хондроцитов на начальной стадии развития [5, 6, 7]. Тем не менее, влияние паратгормона на хондрогенную дифференциацию стволовых клеток остается не полностью выясненным. Если предположить, что ПТГ способствует ранней хондрогенной дифференциации хондропрогениторных клеток, то необходимо выяснить какие дозы данного гормона оказывают при этом положительное влияние.

Таким образом, было выяснено, что ПТГ имеет противоположные эффекты на хондрогенез, в зависимости от концентрации и от схемы добавления гормона в питательные среды.

Однако, несмотря на ряд исследований, влияние различных дозировок 1-34 ПТГ на дифференциацию бычьих прехондробластов до сих пор остается недостаточно изученным.

Исходя из этого, целью настоящего исследования явилось изучение воздействия периодического (I-РТН) и постоянного (С-РТН) введения 1-34 фрагмента ПТГ на дифференциацию бычьих прехондробластов, содержащихся в хондрогенной и остеогенной средах. Кроме того, было проведено исследование способности к репарации хрящевой ткани беспородных крыс и зависимость процессов регенерации от уровня паратиреоидного гормона, а также изменения субхондральной кос-

ти при этом. Были оперированы коленные суставы с целью образования хрящевого дефекта, с дальнейшим исследованием процессов регенерации в зависимости от введения паратормона *in vivo* посредством гистохимического анализа оперированных коленных суставов крыс.

**Методы исследования.** *Выделение прехондробластов из гиалинового хряща.* Гиалиновый хрящ с поверхности мыщелков бычьих бедренных костей был подвергнут последовательному воздействию ферментов: проназы ( $70 \text{ U ml}^{-1}$ , 1 час при  $37^\circ\text{C}$ ) (PRON-RO, Sigma, UK) и коллагеназы ( $300 \text{ U ml}^{-1}$ , 3 часа при  $37^\circ\text{C}$ ) (COLLD-RO, Sigma, UK). Выделенные клетки были культивированы в чашках, предварительно покрытых фибронектином (FN; Sigma, UK). Через 20 мин при  $37^\circ\text{C}$  среда с неадгезированными клетками была удалена и замещена новой питательной средой, содержащей: Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, «Sigma», UK), пенициллин  $10000 \text{ mg ml}^{-1}$ / стрептомицин  $10000 \text{ U ml}^{-1}$  (Penicillin/streptomycin, «Sigma», UK),  $0.1 \text{ mM}$  аскорбиновая кислота (L-ascorbic acid, «Sigma», UK),  $100 \text{ mM}$  HEPES («Sigma», UK), и  $10\%$  fetal bovine serum (FBS, «Sigma», UK). Для стимулирования хондрогенеза в среду добавлялись инсулин-трансферин-селениум (ITS, «GIBCO», UK) и трансформирующий фактор роста  $-\beta$  (TGF- $\beta$ 2; «PeproTech», UK), а с целью исследования остеогенеза клетки содержались в среде с добавлением  $\beta$ -глицерофосфата. Питательная среда замещалась на новую на каждой второй день.

*Посев в системе Transwell.* Хондрогенные клетки посредством центрифугирования были осаждены на мембранах в Transwell системах в концентрации  $10^6$  клеток на  $1,5 \text{ ml}$  и культивированы в хондрогенной и остеогенной средах с постоянным или периодическим добавлением 1-34 ПТГ (PTH 1-34 fragment, rat, «Sigma»). Питательные среды содержали DMEM/F12, с добавлением  $1\%$  ITS («Sigma»),  $10 \text{ mM}$  HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, «Sigma») pH 7.4,  $0,1\%$  гентамицина,  $0,1 \text{ mM}$  дексаметазона («Sigma») и  $10 \text{ ng}$  TGF $\beta$ 2 (PeproTech UK) для стимуляции хондрогенеза, или же  $\beta$ -глицерофосфата с целью стимуляции остеогенеза. При изучении эффекта непрерывного воздействия ПТГ (С-

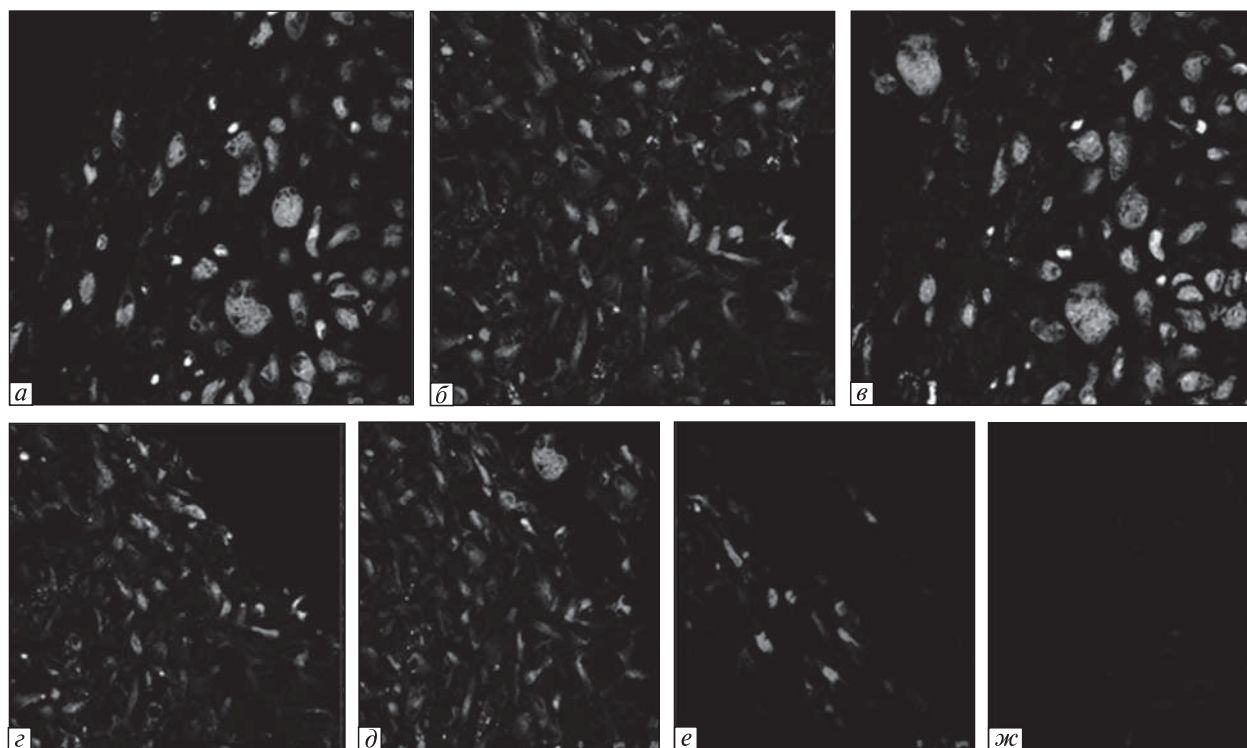
PTH), 1-34 фрагмент добавлялся в среду при каждой ее замене, а при исследовании периодического (I-PTH) через одну смену среды; при этом расчетная доза ПТГ составляла:  $100 \text{ ng}$  ПТГ на  $1 \text{ ml}$  среды. Смена питательной среды производилась на каждый второй день, в общей сложности в течении 21 дня.

*Гистохимическое исследование Transwell культур прехондробластов.* С целью выявления хондрогенеза культуры были окрашены толуидиновым синим, окрашивающим кислые гликозаминогликаны, характерные для хрящевого матрикса. Для определения остеогенеза был использован ализарин, выявляющий очаги кальцификации и являющийся маркером минерализации матрикса. Оценку результатов исследования проводили с использованием метода фазово-контрастной микроскопии с использованием (Eclipse E800; «Nikon» Japan) микроскопа и засняты встроенной камерой (2000R Fast1394; «Retiga» Japan).

*Иммуно-флуоресцентный анализ.* Монослойные культуры прехондробластов были фиксированы в  $4\%$ -ном параформальдегиде и обработаны для выявления иммунологических белков. Первичные антитела, моноклональные анти-крысиные для выявления коллагенов 1 и 2 типа (Col-1, Col-2), и остеокина (bTan20, Developmental Studies Hybridoma Bank, «Iowa», USA), были разведены в трис-буферном солевом растворе (TBS – tris buffered saline) в концентрации  $5 \text{ mg/ml}$  в течении  $12 \text{ ч}$  при  $4^\circ\text{C}$ . Монослойные культуры были так же обработаны изотиоцианатом флуоресцеина (Fluorescein isothiocyanate (FITC, «Sigma»UK)) и затем конъюгированным с анти-кроличьими и анти-мышинными вторичными антителами («Sigma»UK).

Флуоресцентно меченные культуры были установлены в Vectashield (VectorLabs), содержащий 40,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) в качестве контраста для клеточных ядер и просмотрены с помощью микроскопа Olympus BX61.

*Образование дефекта в полную толщину суставного хряща.* Крысы в возрасте 8 недель были оперированы с целью образования дефекта хряща, покрывающего суставную поверхность бедренной кости. Посредством микрохирургии были образованы двусторонние дефекты



**Рис. 1.** Иммунофлюоресцентное окрашивание: *a* – коллаген 1, I-PTH; *б* – коллаген 1, C-PTH; *в* – коллаген 2, I-PTH; *г* – коллаген 2, C-PTH; *д* – остеокальцин, I-PTH; *е* – остеокальцин, C-PTH; *ж* – отрицательный контроль

в полную толщину суставного хряща в коленных суставах обеих задних конечностей. При этом крыс анестезировали внутри брюшным введением (0,5–1,0-ml/kg массы тела) кетамина (100-mg/ml), ксилазина (20-mg/ml) и ацепромазина (10-mg/ml). Доступ к суставной сумке был небольшим (0,5–1,0-см), парапателлярным, суставная капсула была вскрыта с медиальной стороны, коленная чашечка смещена латерально для обнажения суставной поверхности большеберцовой кости. Дефект в полную толщину хряща был образован путем введения в хрящ круговыми движениями стерильной 27Gx ½ иглы. Проникновение в костномозговую полость было подтверждено появлением капли крови на поверхности хряща после удаления иглы. Суставная капсула была закрыта рассасывающейся полипропиленовой нитью, непрерывным швом. Подкожная ткань зашита матрасным швом и кожным клеем Vetclose.

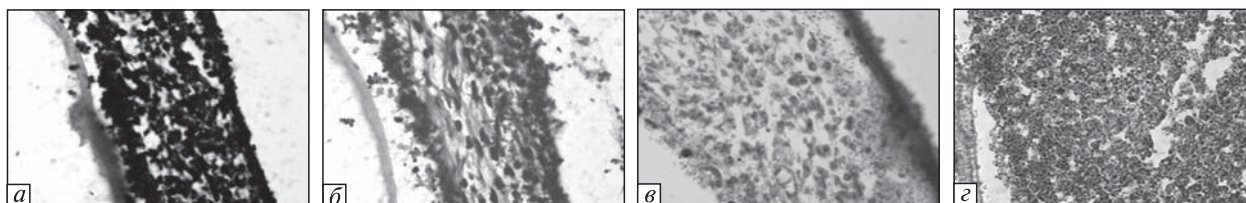
При изучении непрерывного воздействия ПТГ (C-PTH), 1-34 фрагмент вводился каждый день посредством внутримышечной инъек-

ции, при исследовании прерывистого воздействия (I-PTH) через день, при этом расчетная доза ПТГ: 100 нг ПТГ на 1 гр.

**Гистологическое исследование.** Крысы были забиты на 8 неделе после хирургического вмешательства. Оба коленных сустава фиксировали в 10%-ном нейтральном буферном растворе формалина и декальцифицированы с использованием 10%-ной муравьиной кислоты в 5%-ном растворе формальдегида в течение 48 часов при 4 °С. С целью гистологического исследования сагитальные срезы после депарафинизации были окрашены толуидиновым синим и исследованы с использованием микроскопа (Eclipse E800; «Nikon» Japan) с увеличением окуляра ×10 и засняты встроенной камерой (2000R Fast1394; «Retiga» Japan). В каждой экспериментальной группе было использовано по 10 беспородных крыс.

**Результаты и их обсуждение.** Хондропрогениторные клетки (прехондробласты) были выделены из клеточной суспензии благодаря их способности адгезировать к фибронектину. Уже на 1-й день посева клетки приобретают ха-





**Рис. 2.** Хондрогенез, толуидин С-РТН (а); хондрогенез, толуидин, I-РТН (б); остеогенез, ализарин С-РТН (в); остеогенез, ализарин, I-РТН (г); 10×40

рактёрную фибробластоподобную, отростчатую структуру. Четкие колонии обнаруживаются к 7-у дню посева, а на 14-й день клетки достигают 90 % конфлюентного состояния.

При окрашивании монослойных культур иммунофлюоресцентным методом с целью выявления активности коллагена 1 и 2 типов и остеокина, в монослойных культурах прехондробластов, которые культивировались в остеогенной среде с периодическим добавлением 1–34 фрагмента паратиреоидного гормона (I-РТН), была выявлена ярко выраженная флюоресценция с антителами к коллагену 1 типа и остеокину. Как известно, данные белки характерны для костной ткани, т.е. могут считаться маркерами остеогенеза (рис. 1, а, д). В тоже время в монослойных культурах клеток, культивированных в остеогенной среде, однако с постоянным добавлением 1-34 фрагмента ПТГ (С-РТН), флюоресцентное свечение было несколько снижено (рис. 1, б, е). Кроме того, выраженная флюоресценция отмечалась по отношению к коллагену 2 типа в клетках, содержащихся в среде с постоянным добавлением ПТГ (рис. 1, в, г), что свидетельствует об интенсивности хрящеобразования, которое сопровождается накоплением коллагена 2 типа, характерного для хрящевого матрикса.

Прехондробласты также содержались на мембранах в специальных Transwell системах, которые позволяют формирование трехмерных клеточных культур, с их возможной последующей пересадкой в области дефекта скелетных тканей *in vivo* (рис. 2).

Transwell культуры были зафиксированы и окрашены на 21-й день после посева. При этом интенсивное окрашивание толуидином можно увидеть в культурах, содержащихся в хондрогенной среде с постоянным добавлением

ПТГ (рис. 2, а) в отличие от культуры, получающей лишь периодические дозы данного гормона (рис. 2, б).

И наоборот, отложение соединений кальция отмечается в культурах клеток, содержащихся в среде с периодическим введением ПТГ (рис. 2, в), в отличие от ткани, полученной из среды с постоянным высоким уровнем гормона (рис. 2, г). Таким образом, данное исследование подтверждает тот факт, что периодические повышения уровня паратиреоидного гормона активируют образование костной ткани, в то время как постоянные высокие уровни ПТГ приводят к интенсификации хондрогенеза, т.е. могут способствовать восстановлению хрящевой ткани суставов.

Нами было, также, исследовано воздействие постоянного (С-РТН) или периодического (I-РТН) повышения уровня 1-34 ПТГ на восстановление хрящевой ткани *in vivo* у беспородных белых крыс. Выявлено, что постоянное повышение уровня ПТГ способствует восстановлению суставного хряща. При этом область дефекта суставного хряща была заполнена гиалиновой тканью с гладкой поверхностью и интенсивно окрашенным матриксом, богатым протеогликанами. По структуре восстановленный участок не отличался от соседнего неповрежденного хряща, т.е. отмечалась полная интеграция регенерированного участка (рис. 3). В тоже время наблюдалась интенсивная резорбция субхондральной кости, что проявлялось расширением лакун губчатой эпифизарной кости.

В то же время периодическое введение ПТГ мышам способствует утолщению субхондральной кости, однако при этом не происходит восстановления хрящевой ткани. Область дефекта суставного хряща была заполнена слабо окрашенной фиброзной хрящевой

тканью, т.е. отсутствовал хрящевой матрикс, типичный для гиалинового хряща (рис. 4). Пониженная регенерационная активность проявляется на гистологических срезах. Так, в области хрящевого дефекта у крыс выявляется фиброзная хрящевая ткань с характерным светлым окрашиванием матрикса, в то время как при постоянном введении ПТГ область дефекта заполнена гиалиновой тканью с матриксом, богатым протеогликанами и гладкой поверхностью, характерной для здорового гиалинового хряща. Регенерационная ткань аналогична окружающему гиалиновому хрящу по строению и толщине, с полной интеграцией по краям дефекта с окружающим интактным хрящем. Соответственно, постоянное введение ПТГ способствует регенерации суставного хряща, в то время как периодическое снижает регенерационную активность.

Наше исследование подтверждается рядом научных работ. Так, Као et al сообщают, что непосредственная активация сигнального механизма цАМФ форсколином в костных мезенхимных стволовых клетках (КМСК) проявляется повышенной экспрессией генов-маркеров остеобластов, таких как RUNX2, Osterix, коллаген I типа и остеокальцин, и что воздействие ПТГ на МСК увеличивает способность дифференцированных остеобластов к последующей минерализации матрикса [8]. Как и в случае воздействия ПТГ, при воздействии форсколина на костные МСК также увеличивается степень минерализации. При исследовании активности ALP (alkaline phosphatase) посредством RT qPCR было показано, что экспрессия ALP, также как и RUNX2, Osterix, коллагена I типа, остеокальцина и остеопонтинина, была более выражена при периодическом воздействии 1-34 ПТГ, и что добавление форсколина усиливает данные эффекты в большей степени, чем наблюдали в случае одиночного воздействия 1-34 ПТГ. Окрашивание ализарином красным показало, что при периодическом воздействии 1-34 ПТГ значительно усилилась минерализация матрикса, посредством активации цАМФ/РКА. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что периодическое повышение уровня 1-34 ПТГ может повлиять на остеогенез по-

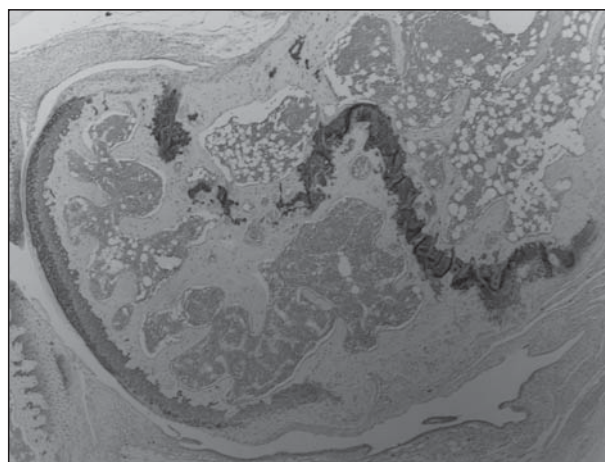


Рис. 3. Постоянное введение ПТГ, ув. 10×40

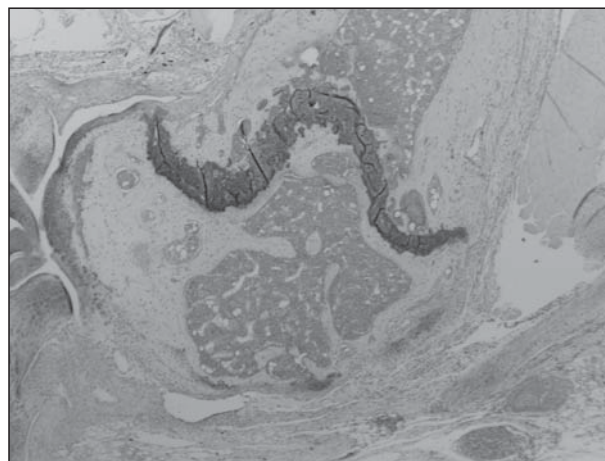


Рис. 4. Периодическое введение ПТГ, ув. 10×40

средством активации остеогенной дифференцировки стволовых клеток [9, 10].

Таким образом, можно заключить, что паратиреоидный гормон кроме его выраженного воздействия на метаболизм костной ткани, может также влиять на регенерацию суставной хрящевой ткани. При этом полученные данные свидетельствуют о модулирующем влиянии ПТГ на хондрогенную дифференциацию МСК и терапевтическом потенциале данного гормона для восстановления хрящевой ткани. На основании клинического опыта эффективности и безопасности гормона для костного метаболизма, ПТГ также может быть применен в клинике для восстановления хряща.

Данное исследование было осуществлено в Университете Суонси (Великобритания), при поддержке профессора Ч. Арчера и финансировано Университетом Суонси, ЕГМУ и Государственным Комитетом по Науке Министерства Образования и Науки Республики Армения (тематическое финансирование 13-3A042).

EFFECT OF 1-34 FRAGMENT OF PARATHYROID HORMONE ON DIFFERENTIATION OF CHONDROPROGENITOR CELLS AND REGENERATION OF ARTHRODIAL CARTILAGE

A.L. Torgomyan

Heratsi Yerevan State Medical University, 2, Koriun Str., Yerevan, Armenia

e-mail: adelinatorgomyan@yahoo.com

This study was aimed at investigating the effect of periodic and continuous administration of 1-34 fragment of parathyroid hormone (PTH) on the differentiation of bovine prechondroblasts maintained in chondrogenic and osteogenic media. In addition, the regeneration of cartilage tissue of outbred rats was studied in terms of the dependence of the mentioned process on the level of parathyroid hormone and the changes in subchondral bone. Monolayer cultures of bovine chondroprogenitor cells, maintained in osteogenic and chondrogenic media, were studied with periodic and continuous administration of 1-34 PTH with subsequent immunofluorescent analysis of relevant markers. Knee joints were also surgically operated to form the deficiency of arthrodial cartilage with further investigation of regeneration processes depending on the administration of PTH in vivo via histochemical analysis of surgically operated knee joints of rats. The data obtained testify to the modulating effect of PTH on chondrogenic differentiation of stem cells and therapeutic potential of this hormone for the restoration of cartilage tissue.

ВПЛИВ 1-34 ФРАГМЕНТА ПАРАТИРЕОЇДНОГО ГОРМОНУ НА ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ХОНДРОПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН І РЕГЕНЕРАЦІЮ СУГЛОБОВОГО ХРЯЩА

A.L. Torgomyan

Метою цього дослідження було вивчення впливу періодичного і постійного введення 1-34 фрагмента паратиреоїдного гормону (ПТГ) на диференціацію бичачих прехондробластів, що містяться в хондрогенному і остеогенному середовищах. Крім того,

було досліджено регенерацію хрящової тканини безпородних щурів і залежність даного процесу від рівня ПТГ, а також зміни субхондральної кістки при цьому. Було досліджено моношарову культуру бичачих хондропрогеніторних клітин, що містяться в остеогенному і хондрогенному середовищах з періодичним і постійним додаванням 1-34 ПТГ, з подальшим імунофлюоресцентним аналізом відповідних маркерів. Також були оперовані колінні суглоби з метою утворення дефекту суглобового хряща, з подальшим дослідженням процесів регенерації в залежності від введення ПТГ in vivo за допомогою гістохімічного аналізу оперованих колінних суглобів у щурів. Отримані дані свідчать про модулюючий вплив ПТГ на хондрогенну диференціацію стовбурових клітин і терапевтичний потенціал даного гормону для відновлення хрящової тканини.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Compston, J.E., Skeletal actions of intermittent parathyroid hormone: Effects on bone remodelling and structure. *Bone*, 2007, vol. 40, no. 6, pp. 1447–52. doi:10.1016/j.bone.2006.09.008.
2. Jiang, Y., Zhao, J., Liao, E.Y., Dai, R.C., Wu, X.P., and Genant, H.K., Application of microCT assessment of 3D bone microstructure in preclinical and clinical studies. *J. Bone Miner. Metab.*, 2005; vol. 23, pp. 122–31.
3. Kaback, L.A., Soung, do Y., Naik, A., Geneau, G., Schwarz, E.M., Rosier, R.N., O’Keefe, R.J. and Drissi, H., Teriparatide (134 human PTH) regulation of osterix during fracture repair. *J. Cell Biochem.* 2008, vol. 105, pp. 219–26. doi: 10.1002/jcb.21816.
4. Chang, J.K., Chang, L.H., Hung, S.H., Wu, S.C., Lee, H.Y., Lin, Y.S., Chen, C.H., Fu, Y.C., Wang, G.J., and Ho, M.L., Parathyroid hormone 1–34 inhibits terminal differentiation of human articular chondrocytes and osteoarthritis progression in rats. *Arthritis Rheum.*, 2009, vol. 60, pp. 3049–60. doi: 10.1002/art.24843.
5. Harrington, E.K., Coon, D.J., Kern, M.F., and Svoboda, K.K., PTH stimulated growth and decreased Col-X deposition are phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate kinase and mitogen activating protein kinase dependent in avian sterna. *Anat. Rec. (Hoboken)*, 2010, vol, 293, no. 2, pp. 225–34. doi: 10.1002/ar.21072.
6. Kudo, S., Mizuta, H., Takagi, K., and Hiraki, Y., Cartilaginous repair of full-thickness articular cartilage defects is induced by the intermittent activation of PTH/PTHrP signaling. *Osteoarthritis Cartilage*,

- 2011, vol. 19, no. 7, pp. 886–94. doi: 10.1016/j.joca.2011.04.007.
7. Mwale, F., Yao, G., Ouellet, J.A., Petit, A., and Antoniou, J., Effect of parathyroid hormone on type X and type II collagen expression in mesenchymal stem cells from osteoarthritic patients. *Tissue Eng Part A*, 2010, vol. 16, no. 11, 3449–55. doi: 10.1089/ten.
  8. Kao, R., Lu, W., Louie, A., and Nissenson, R., Cyclic AMP signaling in bone marrow stromal cells has reciprocal effects on the ability of mesenchymal stem cells to differentiate into mature osteoblasts versus mature adipocytes. *Endocrine*, 2012, vol. 42, no. 6, pp 622–36. doi: 10.1007/s12020-012-9717-9.
  9. Chen, B., Lin, T., Yang, X., Li, Y., Xie, D., and Cui, H., Intermittent parathyroid hormone (1–34) application regulates camp-response element binding protein activity to promote the proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stromal cells, via the cAMP/PKA signaling pathway. *Experimental and therapeutic medicine*, 2016, vol. 11, pp. 2399–406. doi:10.3892/etm.2016.3177.
  10. Zhang, Y., Kumagai, K., and Saito, T., Effect of parathyroid hormone on early chondrogenic differentiation from mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2014, vol. 9, no. 68. doi: 10.1186/s13018-014-0068-5.

Поступила 03.02.18