

ГЕРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА ИЗ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ХРЯЩА МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

А.В. Смирнов¹
Н.И. Чалисова²
Г.А. Рыжак¹
Е.А. Концевая¹
М.А. Войцеховская¹

*¹Санкт-Петербургский
институт биорегуляции
и геронтологии СЗО РАМН*

*²Институт физиологии
им. И.П. Павлова РАН,
г. Санкт-Петербург*

e-mail: ni_chaliso@mail.ru

В органотипической культуре исследовали влияние препарата на основе экстракта из хрящевой ткани хондролюкса, в эффективной концентрации 20 нг/мл, на развитие процессов клеточной пролиферации в эксплантатах ткани хряща от молодых (3 мес) и старых (24 мес) крыс. При действии хондролюкса увеличивалась зона роста в эксплантатах, как от молодых, так и от старых крыс, одновременно увеличивались количественные плотности PCNA-позитивных ядер и уменьшались площади экспрессии проапоптозного белка p53. Полученные результаты о способности хондролюкса стимулировать процессы пролиферации в органотипических культурах хрящевой ткани, как от молодых, так и от старых животных, создают базу для дальнейшего изучения хондролюкса в качестве геропротекторного препарата для лечения заболеваний суставов, ассоциированных с возрастом.

Ключевые слова: органотипическая культура ткани, хрящ, хондролюкс, старение.

В связи с увеличением средней продолжительности жизни и доли пожилых людей в общей численности населения особое внимание специалистов в области биологии и медицины уделяется исследованию закономерностей развития возрастной патологии и разработке новых геропротекторных препаратов. Заболевания хрящевой ткани широко распространены у лиц старших возрастных групп. Дегенеративные процессы в суставах протекают при старении весьма индивидуально, что зависит от образа жизни, профессии, перенесенных заболеваний и других причин. В возрасте старше 60 лет обнаруживаются изменения в сосудах суставной капсулы: отложения солей кальция, признаки атрофии, облитерации, склероза [5]. Иногда отмечается окостенение мягких тканей суставов и внутрисуставных образований. На отдельных участках истончается суставной хрящ, его поверхность мутнеет. При этом наиболее уязвимы краевые зоны суставных хрящей, граничащие с суставной капсулой или со связками, и субхондральные зоны компактного вещества костей, в которых выявляются склеротические изменения [6, 7]. На первой стадии развития остеоартроза наблюдается, при сохранности общей структуры суставного хряща, уменьшение содержания гликозаминогликанов за счет снижения содержания хондроитинсульфата в поверхностной и промежуточной зонах [7]. На второй стадии выявляется очаговое разрушение суставной поверхности, дальнейшее снижение содержания гликозаминогликанов (хондроитинсульфата и кератансульфата) и появление пустых лакун, сопровождающееся разволокнением и расширением матрикса хряща. Третья стадия характеризуется отсутствием поверхностной и верхней частей промежуточной зоны, резким уменьшением количества хондроцитов, а функциональная активность жизнеспособных хондроцитов снижена. В связи с этим идет постоянный поиск биологически активных веществ, которые позволят направленно корректировать функциональную активность хондроцитов, уменьшающуюся при возрастной патологии. Регуляторные пептиды, влияющие на процессы роста и развития, широко распространены в живых организмах и выделяются различными клетками и тканями как эндокринные и аутокринные носители информации о локальном состоянии органа или ткани [3, 9, 10]. Эти низкомолекулярные короткие пептиды (до 10 аминокислотных последовательностей) обладают широким спектром биологического действия и координируют выполнение биологических функций

различными органами и тканями [2, 5, 13]. Поэтому актуальной задачей является поиск геропротекторных биорегуляторных препаратов для тканей хряща.

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН были разработаны методы получения препаратов на основе экстрактов из различных тканей телят [8, 12, 15], в том числе препарата на основе экстракта из хрящевой ткани – хондролукса. Наиболее адекватным методом для быстрой количественной оценки направленности влияния исследуемых биологически активных веществ является органотипическое культивирование фрагментов тканей [2, 10, 11]. Способность влиять на скорость основных клеточных процессов – пролиферацию и апоптоз – и, как следствие, вызывать изменение количества клеток в эксплантатах (по сравнению с контрольными эксплантатами, к которым не добавляются исследуемые вещества), является одним из общих свойств биологически активных веществ. Изменение количества клеток может служить критерием первичной интегральной оценки активности препаратов и являться основанием для поиска других их эффектов.

Целью настоящей работы было исследование действия хондролукса на развитие органотипической культуры фрагментов хрящевой ткани от молодых и старых крыс.

Методика исследования. Органотипическое культивирование тканей проводилось по описанной ранее методике [10, 14]. В экспериментах использовано 500 эксплантатов хрящевой ткани мечевидного отростка 3-месячных (молодых) и 24-месячных (старых) самцов крыс линии *Wistar*. Препарированные в стерильных условиях фрагменты хряща разделяли на более мелкие части величиной около 1 мм³, которые помещали в чашки Петри с коллагеновым покрытием дна. Питательная среда состояла из 35% среды Игла, 35% раствора Хенкса, 25% фетальной телячьей сыворотки. В среду добавляли глюкозу (0,6%), гентамицин (100 ед/мл). Для выявления эффективных концентраций хондролукс вводили в культуральную среду экспериментальных чашек Петри в различных концентрациях – от 0,01 до 100 нг/мл. В чашки Петри с экспериментальными эксплантатами добавляли 3 мл питательной среды с исследуемой концентрацией препаратов, в чашки Петри с контрольными эксплантатами – 3 мл питательной среды; таким образом, эксплантаты экспериментальной и контрольной групп развивались в одинаковых объемах питательной среды. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37 °С в условиях постоянного поступления 5 % CO₂ и через 3 сут. просматривали под фазово-контрастным микроскопом. Определяли индекс площади (ИП), который рассчитывали в условных единицах как отношение площади всего эксплантата (вместе с зоной выселяющихся клеток) к площади центральной зоны эксплантата. Для визуализации эксплантатов применяли микротеленасадку для микроскопа (серия 10, МТН-13 «Альфа-Телеком», Россия). Для расчета ИП эксплантатов использовали программу PhotoM 1.2. Для каждого исследуемого вещества анализировали 20–25 экспериментальных и 20–25 контрольных эксплантатов. Достоверность различий в индексах площади контрольных и экспериментальных эксплантатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения ИП выражали в процентах, контрольное значение ИП принимали за 100%.

Иммуногистохимическое выявление экспрессии проапоптозного белка p53 и маркера пролиферации PCNA проводилось с использованием моноклональных антител к белку p53 (1:75, Novocastra). В качестве вторых антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышинные и антикроличьи иммуноглобулины. Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit), с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (все реагенты от Novocastra). Использовали одноэтапный протокол с демаскировкой антигена (высокотемпературной обработкой ткани) в 0,01 М цитратном буфере pH 7.6. Морфометрическое исследование проводили с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Видео-



тест-Морфология 4.0». В каждом случае анализировали как минимум 10 полей зрения при увеличении $\times 400$. Определяли площадь экспрессии p53, которая представляла отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражалась в процентах. Этот параметр отражает интенсивность синтеза или накопления исследуемой сигнальной молекулы. Результаты обрабатывались с помощью компьютерной программы STATISTIKA 5.0.

Результаты исследования и обсуждение. В первые сутки культивирования происходило распластывание эксплантатов на коллагеновой подложке, выселение пролиферирующих и мигрирующих хондроцитов. В структурной организации периферической зоны эксплантатов выделялась, прежде всего, периферическая зона роста (при измерении которой определяется ИП), а также капсула эксплантата, представленная одним–двумя слоями фибробластов, которая не образовывала сплошного пласта. Имелись обширные просветы в капсуле, через которые часть клеток мигрировала за пределы эксплантата и в процессе пролиферации образовывала зону роста. Среди мигрирующих и пролиферирующих клеток выявлялись макрофаги, фибробласты и специализированные клетки — хондроциты.

Через 3 сут., если в эксперименте имела место стимуляция развития зоны роста, ИП экспериментальных эксплантатов увеличивался по сравнению с ИП контрольных эксплантатов. В случаях угнетения развития зоны роста ИП эксплантатов понижался по сравнению с контрольными значениями.

При раститровке хондролукса в концентрациях от 0,01 до 100 нг/мл было найдено, что препарат обладает стимулирующей пролиферацию активностью в диапазоне концентраций от 20 до 50 нг/мл, при которых увеличение индекса площади (ИП) было статистически достоверным (по сравнению с контрольными эксплантатами), как это представлено в таблицах 1 и 2.

При введении в культуральную среду эксплантатов хряща молодых крыс хондролукса в концентрации 20 нг/мл происходило увеличение ИП на $27 \pm 5\%$ ($n=20$, $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($n=25$ и $n=24$ соответственно). При введении в культуральную среду хондролукса в концентрации 50 нг/мл происходило увеличение ИП на $23 \pm 2\%$ ($n=25$, $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($n=22$ и $n=24$ соответственно).

Таблица 1

Влияние хондролукса на развитие эксплантатов хряща молодых крыс

Концентрация хондролукса	00.1	00.5	01	05	1	10	20	50	100
ИП (%)	6 \pm 1	7 \pm 2	10 \pm 2	3 \pm 1	-3 \pm 1	15 \pm 4	27 \pm 5*	23 \pm 2*	17 \pm 7

При раститровке хондролукса в эксплантатах от старых крыс в диапазоне от 0.01 до 100 нг/мл было найдено, что препарат обладает меньшей стимулирующей пролиферацию активностью, по сравнению с молодыми животными, увеличение индекса площади (ИП) на $21 \pm 3\%$ ($n=22$, $p < 0,05$) было статистически достоверным только при концентрации 50 нг/мл, по сравнению с контрольными эксплантатами ($n=23$ и $n=21$ соответственно), как это представлено в табл. 2. Дальнейшее повышение концентрации приводит значения индекса площади (ИП) к уровню контроля, затем происходит при дальнейших повышении концентраций ингибирование зоны роста.

Таблица 2.

Влияние хондролукса на развитие эксплантатов хряща старых крыс

Концентрация хондролукса	0.01	0.05	0.1	0.5	1	10	20	50	100
ИП (%)	2 \pm 1	8 \pm 2	10 \pm 2	-7 \pm 3	3 \pm 1	5 \pm 2	12 \pm 5	21 \pm 3*	16 \pm 3

Для выявления тканеспецифического действия хондролукса культивировались эксплантаты хрящевой ткани в присутствии полипептидных препаратов из различных других тканей, а также культивировались различные ткани в присутствии эффективных концентраций хондролукса.

При культивировании фрагментов хряща выявлено, что только введение препарата хряща в эффективной концентрации приводило к статистически достоверному увеличению ИП эксплантатов на $23 \pm 3\%$ ($n=21$, $p < 0,05$) по сравнению с ИП контрольных эксплантатов ($n=25$). Другие препараты сосудов, эпифиза, предстательной железы, головного мозга, печени, бронхов, использованные для сравнения эффектов, не вызывали статистически значимых изменений зоны роста эксплантатов хряща, как это происходило при действии хондролюкса.

При культивировании различных тканей в присутствии эффективных концентраций хондролюкса найдено, что препарат в концентрации 20 нг/мл приводил к статистически достоверному увеличению ИП эксплантатов хрящевой ткани на $24 \pm 3\%$ ($n=25$, $p < 0,05$) по сравнению с ИП контрольных эксплантатов ($n=23$). Из остальных исследованных тканей ни одна не демонстрировала увеличения зоны роста эксплантатов в присутствии хондролюкса и ИП оставался на уровне контрольных значений.

Проведено иммуногистохимическое исследование процессов пролиферации и апоптоза при действии хондролюкса в эксплантатах хряща крыс. При исследовании экспрессии проапоптозного белка p53 и маркера пролиферации PCNA в зоне роста эксплантатов хряща крыс при действии хондролюкса в эффективной концентрации 20 нг/мл выявлено достоверное увеличение ИП эксплантатов, а также достоверно увеличивались количественные плотности PCNA-позитивных ядер (NPCNA) и интерфазных клеток, содержащих ядрышковые организаторы (NAgNOR) на $22 \pm 1\%$, что свидетельствует об усилении пролиферативных процессов под действием хондролюкса. При этом наблюдалось одновременное достоверное уменьшение площади экспрессии p53 (рисунок). Это уменьшение находилось в отрицательной корреляции с увеличением зоны роста самого эксплантата под действием хондролюкса. ИП эксплантата под действием хондролюкса увеличивался на $24 \pm 3\%$ ($n=23$, $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($n=24$), а площадь экспрессии белка p53 статистически достоверно снижалась на $20 \pm 5\%$. Это свидетельствует о проапоптотических свойствах хондролюкса, что позволяет с его помощью регулировать процессы пролиферации и программированной гибели клеток, что в свою очередь необходимо для поддержания динамического клеточного баланса [4].

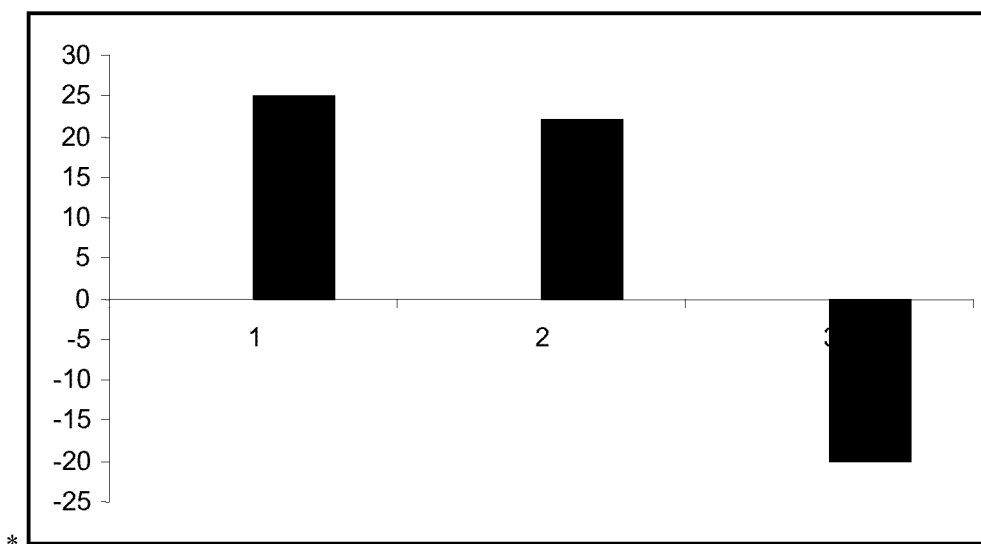


Рис. Влияние хондролюкса на индекс площади (1) эксплантатов хряща, на экспрессию маркера пролиферации PCNA (2) и экспрессию проапоптозного белка p53 (3). Контроль – нулевая линия, * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Следует подчеркнуть эффективность действия очень малых концентраций хондролюкса – 20 нг/мл, при которых стимулировались процессы пролиферации в хрящевой ткани, что приближается к действию ультрамалых доз биологически активных веществ [1]. Это открывает широкие перспективы применения малых доз хондролюкса в гериатрической практике, когда особенно важно использовать небольшие дозировки

лекарственных препаратов во избежание появления аллергических и других побочных реакций.

Полученные результаты о способности хондролукса стимулировать процессы пролиферации в хрящевой ткани создают базу для дальнейшего изучения хондролукса в качестве геропротекторного препарата при патологии суставов, ассоциированной с возрастом.

Литература

1. Гомазков, О.А. Современные тенденции в исследовании физиологически активных пептидов / О.А. Гомазков // Успехи соврем. биологии. 1996. Т. 116, вып. 1. С. 60-68.
2. Калюнов, В.Н. Биология фактора роста нервной ткани / В.Н. Калюнов. – Минск: Наука и техника, 1986.
3. Морозов, В.Г. Выделение, очистка и идентификация иммуномодулирующего полипептида, содержащегося в тимусе телят и человека / В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон // Биохимия. – 1981. – Т. 20. – № 9. – С. 1652–1659.
4. Новиков, В.С. Молекулярные механизмы инициации клеточной гибели / В.С. Новиков, Д.В. Булавина, В.Н. Цыган / В кн.: Программированная клеточная гибель. – СПб.: Наука. – 1998. – С. 30–35.
5. Павлова, В.Н. Синовиальная среда суставов / В.Н. Павлова. – М.: Медицина, 1980.
6. Павлова, В.Н. Хрящ / В.Н. Павлова (и др.). – М.: Медицина. – 1988. – 320 с.
7. Подрушняк, Е.П. Возрастные изменения суставов человека / Е.П. Подрушняк. – Киев. – 1972.
8. Рыжак, Г.А. Модулирующее действие пептидов на развитие эксплантатов кожи в органотипической культуре / Г.А. Рыжак, Е.В. Войтан, Н.И. Чалисова // Успехи геронтологии. – 2007. – Вып.20. – С. 56-58.
9. Хавинсон, В.Х. Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций / В.Х. Хавинсон, В.Г. Морозов, Б.И. Кузник // Успехи соврем. биол. – 1985. – Т. 115. – С. 353–367.
10. Хавинсон, В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов в культуре тканей крыс разного возраста / В.Х. Хавинсон (и др.) // Успехи геронтологии. – 2002. – Вып.9. – С.95-100.
11. Чалисова, Н.И. Реципрокные соотношения пролиферативной активности в центральной и периферической зонах органотипической культуры селезенки при действии вилона у крыс разного возраста / Н.И. Чалисова, Н.М. Быков, П.Н. Зезюлин // Успехи геронтол. – 2003. – Т. 11. – С. 104–108.
12. Чалисова, Н.И. Влияние пептидов головного мозга на клетки нервной ткани *in vitro* / Н.И. Чалисова (и др.) // Цитология. – 1997. – Т. 39. – № 1. – С. 571–578.
13. Chalisova, N.I. Effect of amino acids on cell proliferation and P53 expression in neonatal rats / N.I. Chalisova, A. Zakutzkii // Cell Biology International. – 2008. – Vol. 32. – № 2. – P. 1574–1577.
14. Ryzhak G., Kozlov L., Khavinson V. Peptide bioregulators for correction of urination disturbances in older people. // 6th Congress of the EUGMS. – Dublin. – European Geriatric Medicine: Abstr. – 2010. – С. 140.

THE GEROPROTECTIVE EFFECT OF THE PREPARATION AT THE BASE OF THE EXTRACT FROM THE CARTILAGE TISSUE IN ORGANOTYPIC CARTILAGE TISSUE CULTURE OF THE YOUNG AND OLD RATS

**A.V.Smirnov¹, N.I.Chalisova²
G.A.Rizhak¹, E.A.Kontsevaya¹
M.A.Voytsekhovskaya¹**

¹*St.Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, NMB of RAMS*

²*I.P.Pavlov Institute of Physiology, RAS, St.Petersburg*

e-mail:ni_chalisova@mail.ru

The effect of the preparation at the base of the extract from the cartilage tissue – chondrolux, in the effective concentration 20 ng/ml, was investigated in organotypic tissue culture on the cell proliferation development in the cartilage tissue explants in young (3 months) and old (24 months) rats. The chondrolux demonstrated the stimulated proliferation effect in the tissue culture both from the young and old animals. Synchronously the expression was increased of the proliferation marker PCNA and was decreased the expression of the proapoptotic protein p53. The results obtained can be a base for the further study of chondrolux as the geroprotective preparations.

Keywords: organotypic tissue culture, cartilage, chondrolux, aging.