

# Терапевтический потенциал хондроитинсульфата протеогликана для регенерации межпозвонкового диска

*Реферативный перевод*

**Источник:** International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 6015.

**Takeoka Y., Paladugu P., Kang J.D., Mizuno S.**

Отделение ортопедической хирургии, Гарвардская медицинская школа, Бостон, США

Реферативный перевод подготовлен *И. М. Шугуровой*

Дегенерация межпозвонковых дисков (МПД) является одним из основных факторов риска возникновения боли в спине [1]. Современные хирургические методы лечения дегенеративных заболеваний МПД, такие как патологическое иссечение диска и/или спондилодез, приводят к потере некоторых функций позвоночника. В настоящее время продолжается работа над возможностями регенеративной терапии при этой патологии. Ситуация осложняется тем, что в МПД отсутствуют сосуды, способность к регенерации резидентных клеток, но имеет место непрерывная механическая нагрузка.

МПД имеет сложную структуру с аморфным пульпозным ядром (ПЯ), ограниченным коллагеновым фиброзным кольцом и хрящевыми замыкательными пластинками, поддерживающими сжимающую нагрузку и способствующими многомерным движениям позвоночника [2]. Являясь крупнейшим бессосудистым органом в организме [3], МПД помещает резидентные клетки в чрезвычайно суровую среду — с низким содержанием глюкозы, кислорода и pH, а также с высоким осмотическим давлением (ОД) и повторяющимися нагрузками [4].

Для разработки терапевтических стратегий при патологии МПД внимание исследователей сосредоточено на физиологической микросреде и гомеостазе внутри ПЯ. ПЯ содержит отрицательно заряженный внеклеточный матрикс (ВКМ), который способен поглощать большое количество межклеточной жидкости [3, 5] и генерировать высокое ОД [6, 7]. ПЯ также подвергается изменениям гидростатического давления (ГД) в суточных циклах из-за несения веса в вертикальном положении и разгрузки в лежачем положении [8, 9]. Последние исследования демонстрируют, что повторяющийся режим циклического ГД с последующим постоянным ГД при высокой осмолярности стимулирует активацию анаболического гена и плотное накопление ВКМ в клетках пульпозного ядра крупного рогатого скота (ПЯ КРС) [10, 11]. Следовательно, для поддержания гомеостаза в этих клетках требуется сочетание динамического ГД и высокого ОД внутри диска [10, 12].

В дополнение к описанным клеточным ответам на изменения ГД при высоком ОД, терапевтические подходы с использованием биоматериалов и популяций эндогенных клеток для восстановления кле-

точных свойств и стимуляции производства ВКМ привлекли повышенное внимание к регенерации в МПД [13]. Хотя ни один из биоматериалов не одобрен клинически для восстановления МПД, в основном из-за проблем с безопасностью и неясных механизмов действия, хондроитинсульфат протеогликан (ХСПГ) и гиалуронан (ГА) выбраны в качестве возможных терапевтических агентов, поскольку они являются основными компонентами ВКМ диска и хряща. И ХСПГ, и ГА привлекают межклеточную воду, внося свой вклад в микросреду и механическую структуру ПЯ [14]. Агрекан, основной ХСПГ в МПД, характеризуется высокой плотностью отрицательного заряда из-за сульфатных цепей [15, 16]. ГА представляет собой уникальный несульфатированный гликозаминогликан, молекулярная масса которого достигает миллионов [17], и он оказывает как противовоспалительное, так и анаболическое действие на МПД [18]. Концепция новой терапии заключается в введении извлеченного ХСПГ в поврежденное ПЯ, что предотвращает прогрессирующую дегенерацию и, в конечном итоге, способствует регенерации. На основании предыдущих исследований [10, 11] предполагается, что увеличение концентрации ХСПГ стимулирует анаболические способности клеток ПЯ КРС при повторяющихся изменениях ГД и высокой осмоляльности. Чтобы проверить эту гипотезу, изолированные клетки ПЯ КРС инкубировали с ХСПГ или ГА в повторяющемся режиме циклического ГД при 0,2–0,7 МПа, 0,5 Гц 48 ч с последующим постоянным ГД при 0,3 МПа 24 ч при высокой осмоляльности (450 мОсм / кг H<sub>2</sub>O) в течение 12 дней, и сравнили экспрессию генов и иммуногистохимию метаболических маркеров в культуре клеток. Дополнительно ставилась задача выяснить участие регулятора хондрогенеза TRPV4 (механорецептора временной активации ваниллоида) в метаболизме клеток ПЯ КРС [19, 20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Влияние увеличения плотности ВКМ на метаболизм в клетках ПЯ КРС при ГД

В эксперименте сравнили экспрессию генов, связанных с ВКМ, в клетках ПЯ КРС с добавлением ХСПГ или ГА и инкубированных под нагрузкой ГД или без ГД. Также оценивали гистологические характеристики накопленного кератансульфата (КС) как специфической гликозаминогликановой цепи агрекана для поддержки экспрессии гена основного белка агрекана (*Acan*).

Экспрессия гена *Acan* в клетках ПЯ КРС с ХСПГ и без ГД значительно повышалась по сравнению с контролем (без ХСПГ) в течение 3-х дней ( $p = 0,03$ ). Под влиянием ГД экспрессия гена *Acan* с ХСПГ была

значительно выше, чем в контрольной группе ( $p = 0,007$ ) через 12 дней (рис. 1А). Содержание коллагена типа II (*Col2a1*) в клетках ПЯ КРС с ХСПГ под влиянием ГД было значительно повышено по сравнению с отсутствием ГД через 12 дней ( $p = 0,02$ ).

Экспрессия гиалуронансинтазы 2 (*Has2*) в клетках ПЯ КРС с ХСПГ с ГД была значительно повышена по сравнению с контролем без ХСПГ под влиянием ГД через 12 дней ( $p = 0,002$ ) (рис. 1А).

Иммуногистологическое окрашивание показало локализацию КС в клетках / кластерах ПЯ КРС в контроле без материала и с ХСПГ-накопление было особенно плотным через 12 дней. Также относительно небольшое увеличение плотности КС было обнаружено в клетках / кластерах ПЯ КРС при ГД, эффект был более выраженным через 12 дней (рис. 1В).

Эти результаты показывают, что увеличение концентрации ХСПГ стимулирует анаболический оборот и подавляет экспрессию генов фиброзных молекул в клетках ПЯ КРС в ранние моменты времени. Также предполагается, что ХСПГ оказывает синергетический эффект с динамическим ГД на синтез ВКМ в более поздние моменты времени (12 дней). Однако увеличение ГД не является таким полезным, как введение ХСПГ, для анаболического обмена в клетках ПЯ КРС.

### Влияние увеличения плотности ВКМ на катаболический оборот в клетках ПЯ КРС при ГД

Сравнивалась экспрессия катаболических и антикатаболических генов в клетках ПЯ КРС с введением ХСПГ или ГА, а также в условиях наличия ГД или без него. Также было выполнено иммуногистологическое окрашивание матриксной металлопротеиназы 13 (*Mmp13*).

Экспрессия гена *Mmp13* в клетках ПЯ КРС снижалась под действием ГД по сравнению с отсутствием ГД в контроле, с ХСПГ и с ГА как через 3, так и через 12 дней (3 дня,  $p = 0,004$ ; 12 дней,  $p < 0,001$ ) (рис. 2А). Экспрессия тканевого ингибитора металлопротеиназы 2 (*Timp2*) в клетках ПЯ КРС с ХСПГ под ГД была значительно выше через 12 дней, чем через 3 дня ( $p = 0,01$ ) (рис. 2А).

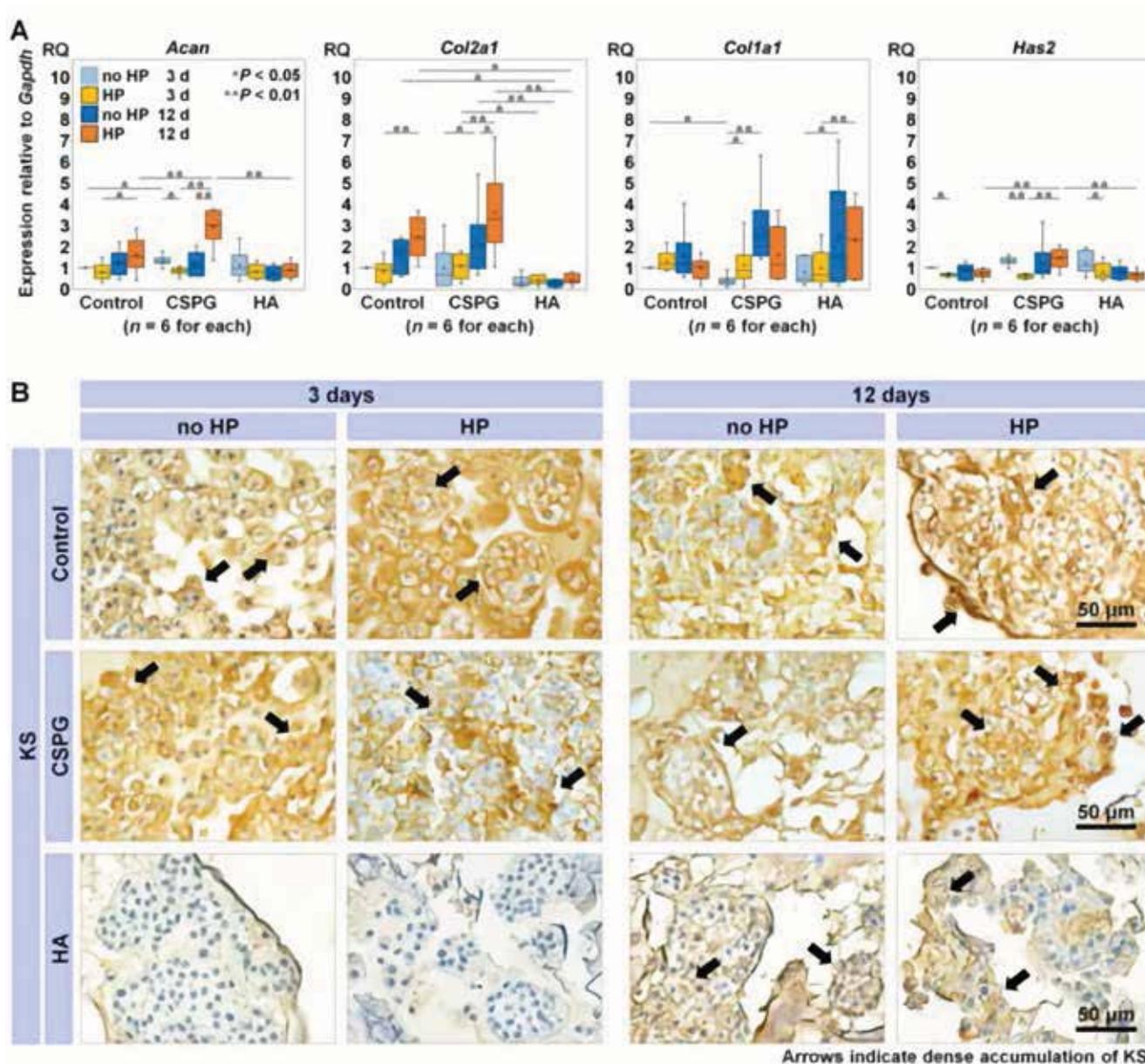
Эти результаты демонстрируют, что повторяющиеся изменения в ГД вызывают подавление катаболической активности *Mmp13* в контроле без материала, с ХСПГ, а также с ГА, и антикатаболическую активизацию *Timp2* в ответ на незначительную активизацию *Mmp13* с контролем без материала и ХСПГ. И наоборот, увеличение концентрации ГА способствует катаболическому обмену независимо от воздействия ГД.

Участие TRPV4 в эффектах накопления ВКМ в клетках ПЯ КРС при ГД

Клетки ПЯ КРС подвергались воздействию циклического и постоянного ГД с использованием системы культивирования при гидростатическом давлении.

Клетки / кластеры ПЯ КРС иммуногистологически окрашивали для выявления TRPV4-механочувствительного канала, проницаемого для кальция [19, 20], в попытке выяснить возможные механизмы воздействия ГД на клетки ПЯ КРС.

Интенсивное окрашивание TRPV4 было обнаружено под воздействием ГД через 3 дня с ХСПГ и ГА, локализованными на поверхности клеток / кластеров; окрашивание было слабее без ГД; интенсивность окрашивания уменьшилась к 12 дню. Процент клеток, положительных по TRPV4, был значительно выше под воздействием ГД, чем при его отсутствии во всех вариантах как через 3, так и через 12 дней (контроль, 3 дня,  $p < 0,001$ ; 12 дней,  $p = 0,03$ ; ХСПГ, 3 дня,  $p < 0,001$ ; 12 дней,  $p = 0,002$ ; ГД, 3 дня,  $p < 0,001$ ;



**Рисунок 1.** Эффекты увеличения плотности внеклеточного матрикса (ВКМ) на скорость метаболизма в клетках пульпозного ядра крупного рогатого скота (ПЯ КРС) при гидростатическом давлении (ГД). (А) Экспрессия генов сердцевинного белка агрекана (Acan), коллагена типа II и I (Col2a1 и Col1a1), гиалуронансинтазы 2 (Has2) с контролем без материала, хондроитинсульфат протеогликана (CSPG, ХСПГ) и гиалуронана (ГА) под контролем отсутствия ГД и при ГД через 3 и 12 дней по сравнению с контролем без ГД через 3 дня ( $n = 6$  для каждого.  $p < 0,01$ ). (Б) Накопление кератансульфата (KS, КС), контрастированного гематоксилином. Стрелки указывают на интенсивное накопление, каждая секция имеет толщину 7 мкм, а полоса указывает на 50 мкм.

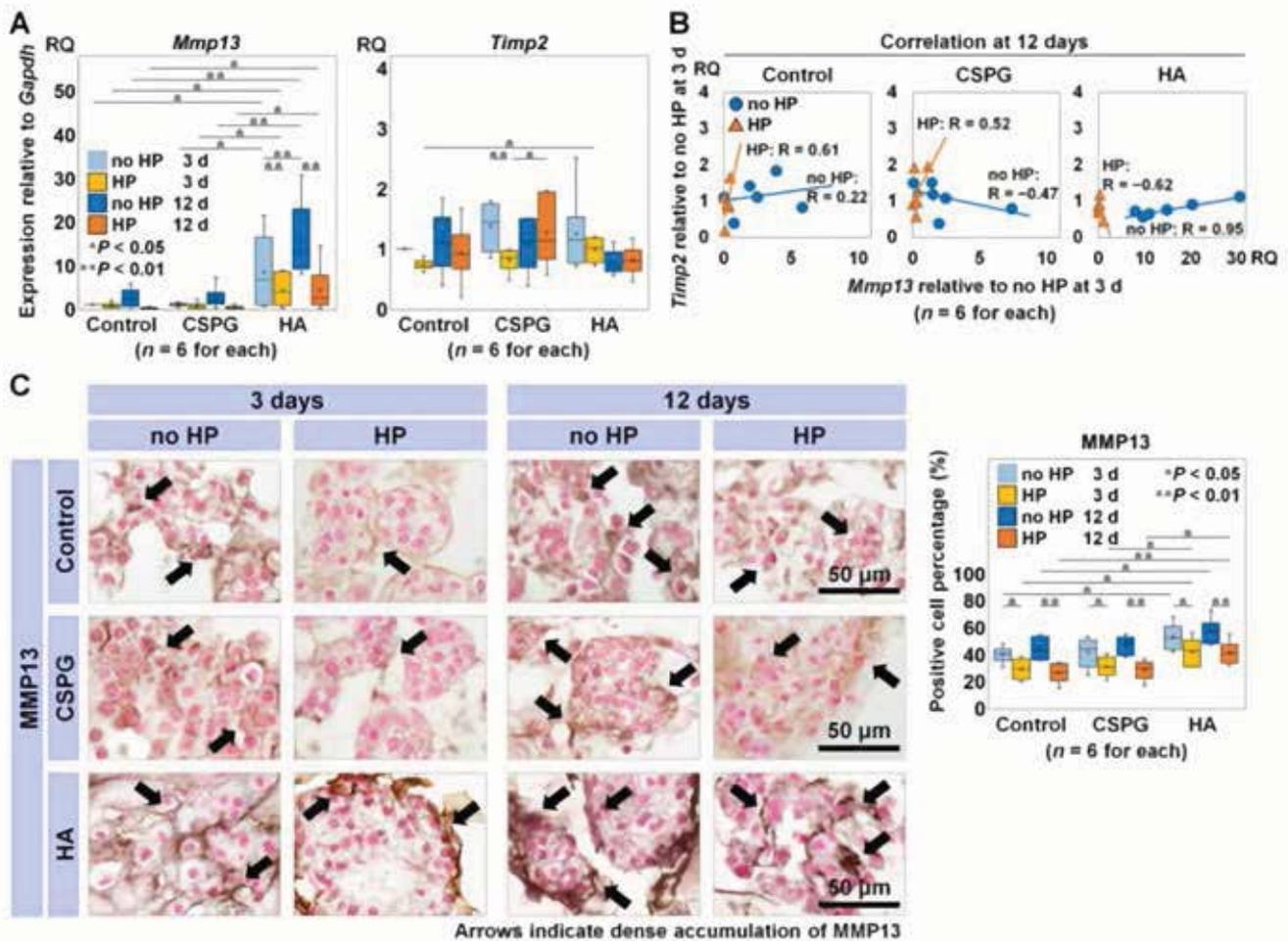
12 дней,  $p = 0,02$ ). Иммунопозитивность была ниже через 12 дней, чем через 3 дня под воздействием ГД во всех вариантах, хотя эта разница достигла статистической значимости только с ХСПГ ( $p = 0,02$ ) (рис. 3). Эти результаты подтверждают тот факт, что активация TRPV4 участвует в клеточных ответах на динамическое ГД, особенно на ранних фазах культивирования.

## ОБСУЖДЕНИЕ

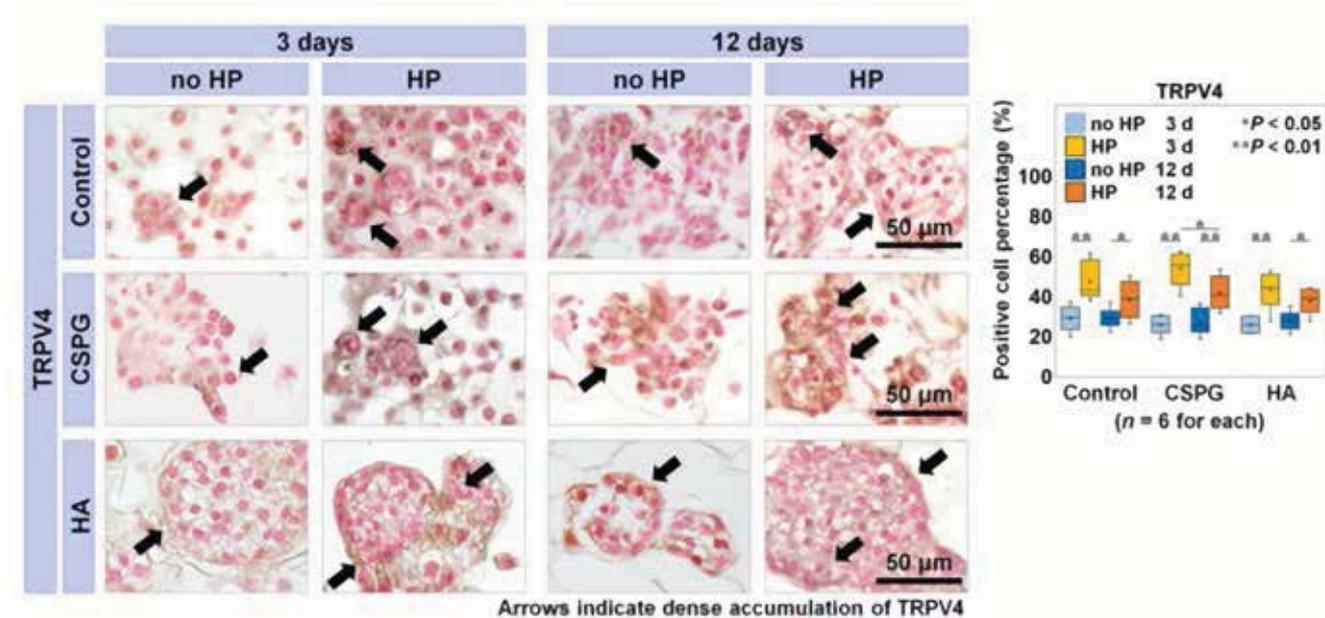
Некоторые терапевтические агенты на основе ВКМ стимулируют метаболизм клеток МПД, хотя их клинические эффекты полностью не изучены [13]. Результаты представленного исследования проливают свет на положительный эффект увеличения введения ХСПГ и ГА на метаболические процессы в клетках

ПЯ КРС при чередовании циклических и постоянных значений ГД, имитирующих дневные движения позвоночника. Как и следовало ожидать, обнаружилось, что увеличение плотности ВКМ, в частности, при введении ХСПГ, способствует стимуляции регенеративного оборота в клетках за счет восстановления естественной микросреды ВКМ.

Значительное повышение экспрессии гена *Acan* и подавление выработки *Col1a1* под влиянием ХСПГ в отсутствие ГД через 3 дня наблюдений демонстрирует анаболические и антифиброзные эффекты ХСПГ на ранних этапах инкубации. Кроме того, значительное усиление активности *Acan* и *Col2a1* с ХСПГ под воздействием ГД в течение 12 дней указывает на синергизм увеличения концентрации ХСПГ



**Рисунок 2.** Эффекты увеличения плотности внеклеточного матрикса (ВКМ) на катаболический оборот в клетках пульпозного ядра крупного рогатого скота (ПЯ КРС) при гидростатическом давлении (ГД). (А) Экспрессия генов катаболической матричной металлопротеиназы 13 (*Mmp13*) и антикатаболического тканевого ингибитора металлопротеиназы 2 (*Timp2*) с контролем без материала, хондроитинсульфат протеогликаном (CSPG, ХСПГ) и гиалуронатом (ГА) без ГД и с ГД через 3 и 12 дней по сравнению с контролем без ГД через 3 дня ( $n = 6$  для каждого).  $p < 0,01$ . *Gardh*, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. RQ, относительное количество. (Б) Корреляция между экспрессией *Mmp13* и *Timp2* с контролем, ХСПГ и ГА без ГД и с ГД через 12 дней по сравнению с контролем без ГД через 3 дня ( $n = 6$  для каждого). (С) Накопление *Mmp13* в черном цвете с контрастным красным и процент положительных клеток *Mmp13* ( $n = 6$  для каждого). Стрелки указывают на интенсивное накопление, каждая секция имеет толщину 7 мкм, а полоса указывает на 50 мкм.  $p < 0,01$ .



**Рисунок 3.** Влияние временного рецепторного потенциала ваниллоида-4 (TRPV4) на эффекты увеличения плотности внеклеточного матрикса (ВКМ) в клетках пульпозного ядра крупного рогатого скота (ПЯ КРС) при гидростатическом давлении (ГД). Показано накопление TRPV4 в черном цвете с контрастным красным и процент положительных клеток TRPV4 ( $n = 6$  для каждого). Стрелки указывают на интенсивное накопление, каждая секция имеет толщину 7 мкм, а полоса указывает на 50 мкм.  $p < 0,01$ .

сочетании с динамическим ГД в более поздний момент времени. Экспрессия *Has2* и *Acan* показали аналогичную тенденцию, что согласуется с работами Holmes [21], Roughley [22], и Sivan [23], в которых описывается тесная связь между ГА и агреканом как в суставном хряще, так и в МПД.

Кроме того, повторяющиеся изменения в ПЯ также вызывают катаболическое подавление *Mmp13* и антикатаболическое повышение *Timp2* в ответ на незначительное повышение уровня *Mmp13* даже

без какого-либо внешнего воздействия. Поскольку катаболизм дискового ВКМ уравнивается ингибирующими эффектами *Timp* [24], динамическое ГД стимулирует антикатаболические процессы в клетках ПЯ КРС и подавляет катаболические изменения. В приведенном исследовании ГА ингибировал синтез ВКМ и способствовал катаболическому обмену под влиянием ГД и без него. Введение ГА оказывает анаболическое и противовоспалительное действие на хондроциты человека [25], а внутрисуставное

Патогенетическая терапия хондропротекторами — это возможность предотвратить дегенерацию диска, уменьшить интенсивность воспаления, что позволит пациенту жить без боли.

Значимыми преимуществами в сдерживании дегенеративных процессов в межпозвоночных дисках обладает препарат Амбене®Био. Высокая эффективность препарата и его модулирующее хондропротективное действие обусловлены синергией четырех компонентов: мукополисахаридов (хондроитина сульфат), комплекса полипептидов, имеющих молекулярную массу 300–600 Да (цитомедины), 15 аминокислот и макро / микроэлементов (ионы натрия, калия, магния, железа, меди и цинка).

Результаты последних клинических исследований препарата говорят о выраженном снижении боли (уменьшение выраженности болевого синдрома по ВАШ на 40–57 % при движении и на 54–71 % в покое), улучшении функциональной активности суставов и замедлении прогрессирования воспаления у пациентов, страдающих дегенеративно-дистрофическими заболеваниями опорно-двигательного аппарата, в частности остеоартроз и остеохондроз.

Применение Амбене®Био дает возможность снизить потребность в нестероидных противовоспалительных препаратах и сократить их применение, что особенно важно у коморбидных пациентов. Анальгетический и хондропротективный эффект препарата Амбене®Био наблюдается уже после первого курса терапии и сохраняется до 6 месяцев. Кроме того, препарат Амбене®Био — это возможность назначения удобной короткой схемы терапии: по 2 мл через день курсом 10 инъекций. Короткая и удобная схема терапии позволит быстро и эффективно достигнуть длительного и стойкого терапевтического эффекта.

введение ГА является признанным методом лечения остеоартрита коленного сустава [26]. Однако активность гиалуронсинтазы (ГАС), по-видимому, является важным фактором, и анаболические и антикатаболические эффекты внеклеточного ГА без активации ГАС могут быть ограничены *in vitro* [27]. Поскольку введенный ГА, используемый в эксперименте, коммерчески доступен в качестве клеточного каркаса для культуры клеток *in vitro*, требуется тщательная интерпретация для оценки клинической значимости наших результатов.

## Выводы

В исследовании были оценены метаболические процессы в изолированных клетках ПЯ КРС в присутствии ХСПГ и ГА в повторяющемся режиме циклических и постоянных значений ГД, имитирующих циркадные изменения внутри межпозвонкового диска. Введение ХСПГ вызывает усиление экспрессии анаболического гена *Acan* и подавление выработки фиброзного агента *Col1a1* в культуре клеток, начиная с ранних этапов наблюдения. Высказано предположение, что ХСПГ обладает анаболическим синергизмом в сочетании с динамическим ГД, влияя на синтез ВКМ на более поздних этапах эксперимента. Повторяющийся режим динамического ГД также вызвал катаболическое подавление *Mmp13*. Однако увеличение концентрации ГА не обеспечило анаболической стимуляции, но способствовало катаболической экспрессии *Mmp13*, независимо от воздействия ГД. Это подтверждает тот факт, что введение ХСПГ было наиболее оправданным и эффективным по сравнению с действием ГА. Получены данные, что TRPV4 может участвовать в передаче сигнала в клетках ПЯ, особенно на ранних этапах инкубации, а ХСПГ может способствовать регенерации МПД путем воспроизведения микроокружения ВКМ вокруг клеток ПЯ.

## Литература

1. Livshits, G.; Popham, M.; Malkin, I.; Sambrook, P.N.; MacGregor, A.; Spector, T.; Williams, F.M.K. Lumbar disc degeneration and genetic factors are the main risk factors for low back pain in women: The UK Twin Spine Study. *Ann. Rheum. Dis.* 2011, 70, 1740–1745.
2. Urban, J.P.; Roberts, S. Degeneration of the intervertebral disc. *Arthritis Res. Ther.* 2003, 5, 120–130.
3. Urban, J.P.; Smith, S.; Fairbank, J.C. Nutrition of the Intervertebral Disc. *Spine* 2004, 29, 2700–2709.
4. Yurube, T.; Buchser, W.J.; Moon, H.J.; Hartman, R.A.; Takayama, K.; Kawakami, Y.; Nishida, K.; Kurosaka, M.; Vo, N.V.; Kang, J.D.; et al. Serum and nutrient deprivation increase autophagic flux in intervertebral disc annulus fibrosus cells: An *in vitro* experimental study. *Eur. Spine J.* 2019, 28, 993–1004.
5. Ishihara, H.; Waresjio, K.; Roberts, S.; Urban, J.P. Proteoglycan synthesis in the intervertebral disk nucleus: The role of extracellular osmolality. *Am. J. Physiol. Content* 1997, 272, C1499–C1506.
6. Schröder, Y.Y.; Aivan, S.; Wilson, W.W.; Merkher, Y.; Huyghe, J.J.; Maroudas, A.; Baaijens, F.P.T. Are disc pressure, stress, and osmolality affected by intra- and extracellular fluid exchange? *J. Orthop. Res.* 2007, 25, 1317–1324.
7. Bezci, S.E.; O'Connell, G.D. Osmotic Pressure Alters Time-dependent Recovery Behavior of the Intervertebral Disc. *Spine* 2018, 43, E334–E340.
8. Urban, J.; Maroudas, A.; Bayliss, M.; Dillon, J. Swelling pressures of proteoglycans at the concentrations found in cartilaginous tissues. *Biorheology* 1979, 16, 447–464.
9. Wilke, H.; Neef, P.; Caimi, M.; Hoogland, T.; Claes, L.E. New In Vivo Measurements of Pressures in the Intervertebral Disc in Daily Life. *Spine* 1999, 24, 755–762.
10. Mizuno, S.; Kashiwa, K.; Kang, J.D. Molecular and histological characteristics of bovine caudal nucleus pulposus by combined changes in hydrostatic and osmotic pressures *in vitro*. *J. Orthop. Res.* 2018, 37, 466–476.
11. Takeoka, Y.; Kang, J.D.; Mizuno, S. In vitro nucleus pulposus tissue model with physicochemical stresses. *JOR Spine* 2020, 3, 1105.
12. Ziv, I.; Moskowitz, R.W.; Kraise, I.; Adler, J.H.; Maroudas, A. Physicochemical properties of the aging and diabetic sand rat intervertebral disc. *J. Orthop. Res.* 1992, 10, 205–210.
13. Takeoka, Y.; Yurube, T.; Morimoto, K.; Kunii, S.; Kanda, Y.; Tsujimoto, R.; Kawakami, Y.; Fukase, N.; Takemori, T.; Omae, K.; et al. Reduced nucleotomy-induced intervertebral disc disruption through spontaneous spheroid formation by the Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCoL). *Biomaterials* 2020, 235, 119781.
14. Priyadarshani, P.; Li, Y.; Yao, L. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration. *Osteoarthr. Cartil.* 2016, 24, 206–212.
15. Kiani, C.; Chen, L.; Wu, Y.J.; Yee, A.J.; Yang, B.B. Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* 2002, 12, 19–32.
16. Chandran, P.L.; Horkay, F. Aggrecan, an Unusual Polyelectrolyte: Review of Solution Behavior and Physiological Implications. *Acta Biomater.* 2012, 8, 3–12.
17. Fraser, J.R.E.; Laurent, T.C.; Laurent, U.B.G. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* 1997, 242, 27–33.
18. Kazezian, Z.; Li, Z.; Alini, M.; Grad, S.; Pandit, A. Injectable Hyaluronic Acid Down-Regulates Interferon Signaling Molecules, Igfbp3 and Ifit3 in the Bovine Intervertebral Disc. *Acta Biomater.* 2017, 52, 118–129.
19. O'Connor, C.J.; Leddy, H.A.; Benefield, H.C.; Liedtke, W.B.; Guilak, F. TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 1316–1321.
20. Palacio-Mancheno, P.E.; Evashwick-Rogler, T.W.; Laudier, D.M.; Purmessur, D.; Iatridis, J.C. Hyperosmolality induces notochordal cell differentiation with aquaporin3 upregulation and reduced N-cadherin expression. *J. Orthop. Res.* 2017, 36, 788–798.
21. Holmes, M.W.A.; Bayliss, M.T.; Muir, H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem. J.* 1988, 250, 435–441.
22. Roughley, P.J.; Mort, J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J. Exp. Orthop.* 2014, 1, 8.
23. Sivan, S.S.; Wachtel, E.; Roughley, P. Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2014, 1840, 3181–3189.
24. Vo, N.V.; Hartman, R.A.; Yurube, T.; Jacobs, L.J.; Sowa, G.A.; Kang, J.D. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine J.* 2013, 13, 331–341.
25. Levett, P.A.; Melchels, F.P.; Schrobback, K.; Hutmacher, D.W.; Malda, J.; Klein, T.J. A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Acta Biomater.* 2014, 10, 214–223.
26. Strand, V.; Conaghan, P.; Lohmander, L.; Koutsoukos, A.; Hurley, F.; Bird, H.; Brooks, P.; Day, R.; Puhl, W.; Band, P. An integrated analysis of five double-blind, randomized controlled trials evaluating the safety and efficacy of a hyaluronan product for intra-articular injection in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthr. Cartil.* 2006, 14, 859–866.
27. Ishizuka, S.; Tsuchiya, S.; Ohashi, Y.; Terabe, K.; Askew, E.B.; Ishizuka, N.; Knudson, C.B.; Knudson, W. Hyaluronan synthase 2 (HAS2) overexpression diminishes the pro-catabolic activity of chondrocytes by a mechanism independent of extracellular hyaluronan. *J. Biol. Chem.* 2019, 294, 13562–13579.