

Пространственное распределение протеогликанов суставного хряща в условиях внутрисуставного введения аллогенных белков сурфактанта в эксперименте у крыс

П.А. Крылов¹✉, И.М. Романова¹, Е.Д. Великанова¹, П.А. Зыбинская¹,
А.А. Абдулова¹, В.Л. Загребин², В.В. Новочадов¹

¹ Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия

² Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. В настоящее время во всем мире ведутся разработки новых препаратов для вискозапплементарной терапии. При этом крайне мало работ, посвященных изучению пространственного распределения протеогликанов суставного хряща после применения препаратов. Белки легочного сурфактанта, которые обладают схожими лубрикативными функциями с протеогликанами суставного хряща, являются возможными перспективными веществами для вискозапплементарной терапии. Цель исследования – изучить влияние смеси аллогенных белков сурфактанта (САБС) на пространственное распределение протеогликанов и экспрессию ИЛ-1 в суставном хряще после их внутрисуставного введения. Для оценки пространственного распределения протеогликанов проводились морфологические и иммуногистохимические исследования с использованием антител к агрекану и лубрицину, а для выявления возможного провоспалительного процесса применялись антитела к ИЛ-1. Через 3 недели после внутрисуставного введения САБС толщина суставного хряща и рельеф суставной поверхности не изменились в сравнении с интактными крысами. При этом после введения САБС было зафиксировано уменьшение числа иммунопозитивных хондроцитов к агрекану в промежуточной зоне суставного хряща и увеличение к ИЛ-1. Полученные данные в ходе исследования могут быть использованы для дальнейших исследований САБС в условиях экспериментального остеоартроза.

Ключевые слова: морфология, белки сурфактанта, суставной хрящ, агрекан, лубрицин, ИЛ-1, крыса

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ для молодых ученых кандидатов наук МК-199.2022.1.4.

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2023-20-4-147-151>

Spatial distribution proteoglycans articular cartilage of femoral condyles and tibial plateau in experimental osteoarthritis in rats

P.A. Krylov¹✉, I.M. Romanova¹, E.D. Velikanova¹, P.A. Zybinskaya¹,
A.A. Abdulova¹, V.L. Zagrebina², V.V. Novochadov¹

¹ Volgograd State University, Volgograd, Russia

² Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. Currently, worldwide research is being conducted on the development of new drugs for viscosupplementation therapy. However, there are a very few studies dedicated to the spatial distribution of proteoglycans in articular cartilage after the use of these drugs. Pulmonary surfactant proteins, which have lubricative functions similar to those of articular cartilage proteoglycans, are possible promising substances for viscosupplementation therapy. The aim of this study is to investigate the effect of a mixture of allogenic surfactant proteins (MASP) on the spatial distribution of proteoglycans and the expression of IL-1 in articular cartilage after their intra-articular injection. Morphological and immunohistochemical studies were conducted using antibodies to aggrecan and lubricin to assess the spatial distribution of proteoglycans, and antibodies to IL-1 were used to identify potential pro-inflammatory processes. Three weeks after intra-articular injection of MASP, the thickness of the articular cartilage and the relief of the joint surface did not change compared to intact rats. However, a decrease in the number of immunopositive chondrocytes to aggrecan in the intermediate zone of the articular cartilage and an increase in IL-1 were observed after MASP injection. The obtained data during the study can be used for further research on MASP in the conditions of experimental osteoarthritis.

Keywords: morphology, surfactant protein, articular cartilage, aggrecan, lubricin, IL-1, rat

Funding. The study was supported by a grant from the President of the Russian Federation for young scientists candidates of sciences МК-199.2022.1.4.

Остеоартроз (ОА) – одно из самых распространенных заболеваний в мире [1, 2]. На развитие ОА влияет большое число разных факторов, одним

из которых является высокая физическая нагрузка на опорно-двигательную систему [3]. В клинической практике широкое распространение при лечении ОА

получила вискоэлапплементарная терапия [4]. В данной работе уделяется внимание белкам сурфактанта, выполняющим лубрикативную функцию в легочных альвеолах. Выбор этих белков был основан на биомиметическом принципе по отношению к лубрицину. В состав легочного сурфактанта человека входят 4 белка: SP-A, SP-B, SP-C, SP-D. Согласно нашим предыдущим исследованиям, на основе анализа структурной гомологии, было определено, что на лубрикативные свойства синовиальной жидкости могут оказывать влияние только SP-B, SP-C, SP-D [5]. Также особенности строения суставного хряща и наличие протеогликанов обеспечивают ему определенную защиту к избыточным механическим нагрузкам [6]. Среди протеогликанов особый интерес представляют такие белки, как лубрицин и агрекан, поскольку именно их баланс, по современным представлениям, определяет прочностные и трибологические свойства суставного хряща [7].

Исходя из вышесказанного, открытым остается вопрос, могут ли аллогенные белки сурфактанта привести к развитию воспалительного процесса, в частности, к экспрессии ИЛ-1, а также привести к изменению пространственного распределения лубрицина и агрекана в суставном хряще при их внутрисуставном введении.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние аллогенных белков сурфактанта на пространственное распределение лубрицина, агрекана и экспрессию ИЛ-1 в суставном хряще.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы суставного хряща были взяты у 12 самцов белых крыс линии Wistar, массой 150–200 г. Все манипуляции проводили в соответствии с этическими нормами, изложенных в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Выведение животных осуществляли с помощью внутрибрюшинного введения десятикратной дозы препарата «Рометар», Россия (200 мг/кг массы).

У шести крыс контрольной группы были взяты 12 коленных суставов для исследования в интактном состоянии. В первой экспериментальной группе, состоящей из шести крыс, также были взяты 12 коленных суставов, где внутрисуставно вводилась смесь аллогенных белков (САБС), состоящая из SP-D (RPB039Hu01, Cloud-Clone, Китай), SP-B (RPB622Hu01, Cloud-Clone, Китай) и SP-C человека (RPB623Hu01, Cloud-Clone, Китай) в концентрации 1 мкг/мл. Животных из каждой группы выводили спустя 3 недели.

Материал фиксировали в 10%-м растворе забуференного формалина и декальцинировали по стан-

дартной методике с помощью раствора трилона Б. Срезы коленного сустава толщиной 3–5 мкм были получены с помощью ротационного микротомы Leica RM 2125 RTS (Leica, США) и помещены на предметные стекла, предварительно обработанные адгезивом (БиоВитрум, Россия). Окраску препаратов осуществляли сафранином О.

Выявление протеогликанов и ИЛ-1 в суставном хряще проводили с помощью иммуногистохимического исследования. В работе были использованы первичные антитела кролика к лубрицину 1:50 (DF13331, Affinity Biosciences, Китай [RRID: AB_2846350]), агрекану (DF7561 Affinity Biosciences, Китай [RRID: AB_2841055]) и ИЛ-1 (DF6893 Affinity Biosciences, Китай [RRID: AB_2838852]) крысы. Также использовались вторичные антитела козы против антител кролика с пероксидазной меткой (S0001, Affinity Biosciences, Китай [RRID: AB_2839429]) в разведении 1:50 для всех антител. Набор DAB Chromogen (IS046, Cloud-Clone Corp., Китай) использовался для визуализации иммунопозитивного материала.

Анализ полученных изображений гистологических препаратов с помощью цифровой камеры для микроскопа TourCam (TourTek, Китай) осуществлялся с использованием программы в свободном доступе ImageJ v. 1.53t (National Institutes of Health, США). Морфометрия суставного хряща включала измерение радиальной толщины хряща (мкм), рельефа суставной поверхности (усл. ед.), численной плотности хондроцитов ($1/\text{мм}^3$) поверхностной зоны. Иммуногистохимическую реакцию с агреканом, лубрицином и ИЛ-1 в цитоплазме, межклеточном пространстве и ЭЦМ оценивали путем расчета доли иммунопозитивных клеток (%). Количественные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 12.0 (StatSoftInc., США). Для доказательства достоверности различий был применен критерий Манна – Уитни для двух независимых выборок ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У интактных крыс при окраске сафранином О не было выявлено элементов разрушения суставного хряща. Суставная поверхность имела гладкий рельеф и наблюдалась типичная локализация хондроцитов, согласно зональной структуре суставного хряща (рис. 1А). На третьей неделе после внутрисуставного введения САБС каких-либо повреждений суставного хряща выявлено не было, как и у интактной группы (рис. 1Б).

Результаты морфометрии суставного хряща до и после внутрисуставного введения САБС представлены в таблице. У крыс через три недели после введения САБС толщина суставного хряща была выше на 5 %

по сравнению с величиной показателя у интактных животных ($p > 0,05$). При анализе рельефа суставной поверхности не было выявлено различий между исследуемыми группами ($p > 0,05$). В эксперименталь-

ной группе численная плотность клеток поверхностной зоны суставного хряща была в 1,4 раза меньше в сравнении с величиной показателя у интактных крыс ($p > 0,05$).

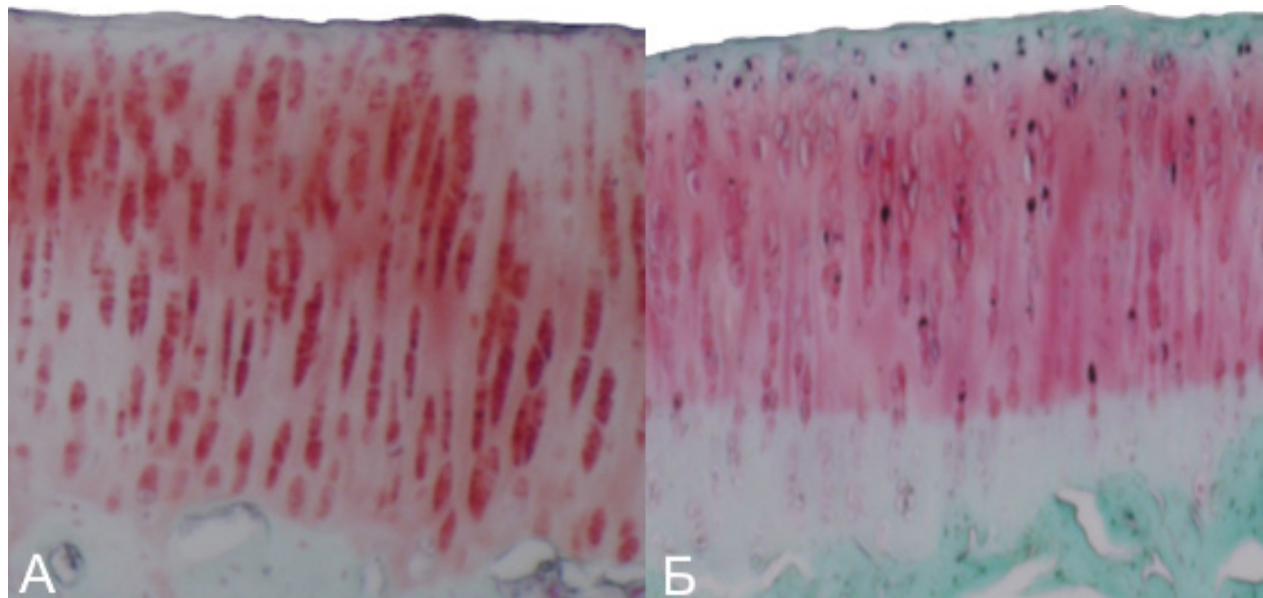


Рис. 1. Суставной хрящ:

А – интактное состояние; Б – через три недели после внутрисуставного введения САБС. Окрашивание сафранином О, $\times 40$

Анализ морфометрических параметров суставного хряща до и после внутрисуставного введения САБС

Морфологические параметры	Интактная группа	Через 3 недели после введения САБС
Радиальная толщина хряща, мкм	122 [105 ÷ 148]	135 [119 ÷ 163]
Рельеф суставной поверхности, безразмерная величина	1,02 [1,01 ÷ 1,04]	1,02 [1,02 ÷ 1,03]
Численная плотность хондроцитов поверхностной зоны, 1/мм ³	291* [208 ÷ 439]	205* [170 ÷ 314]
Доля иммунопозитивных хондроцитов к агрекану, %	41* [33 ÷ 56]	27* [19 ÷ 34]
Доля иммунопозитивных хондроцитов к лубрицину, %	18 [10 ÷ 31]	18 [6 ÷ 32]
Доля иммунопозитивных хондроцитов к ИЛ-1, %	2* [1 ÷ 3]	15* [9 ÷ 19]

* Статистически значимые отличия параметров суставного хряща между группами, критерий Манна – Уитни ($p > 0,05$).

В результате исследования пространственного распределения агрекана, лубрицина и ИЛ-1 было выявлено, что введение САБС приводит к изменению доли иммунопозитивных хондроцитов в суставном хряще (рис. 2, табл.). Через три недели после внутрисуставного введения САБС выявлялась слабая окраска на агрекан в поверхностной и промежуточной зонах суставного хряща (рис. 2Б). При этом доля иммунопозитивных хондроцитов была меньше в 1,5 раза по сравнению с интактным суставным хрящом ($p < 0,05$).

Пространственное распределение лубрицина в суставном хряще и доля иммунопозитивных хондроцитов не различались между интактной и экспериментальной группами ($p > 0,05$) (рис. 2В, Г), хотя интенсивность окраски хондроцитов и ЭЦМ была ниже через три недели после внутрисуставного введения САБС.

После введения САБС значительно (в 8 раз) возросла доля иммунопозитивных клеток к ИЛ-1 ($p < 0,05$) (рис. 2Д, Е), в то время как в интактном суставном хряще его экспрессия не наблюдалась. Стоит отметить, что иммунопозитивные хондроциты к ИЛ-1 локализовались преимущественно в промежуточной зоне.

Полученные данные указывают, прежде всего, на закономерное пространственное распределение агрекана, лубрицина и ИЛ-1. В частности, ожидаемо, что в интактном состоянии экспрессия ИЛ-1 должна отсутствовать, что в итоге и подтвердили наши результаты иммуногистохимического исследования. Интересный факт, который был нами обнаружен, – внутрисуставное введение САБС не привело к нарушению целостности

суставной поверхности, но вызвало снижение численной плотности хондроцитов поверхностной зоны, а также появление иммунопозитивных хондроцитов к ИЛ-1 в промежуточной зоне. В то же время мы зафиксировали уменьшение экспрессии агрекана после введения САБС. Такие неоднозначные результаты эффективности и безопасности САБС могут быть связаны с тем, что экспрессия ИЛ-1 и гибель хондроцитов могли быть вызваны комплексным ответом на повреждение сустава за счет прокола иглой шприца [8].

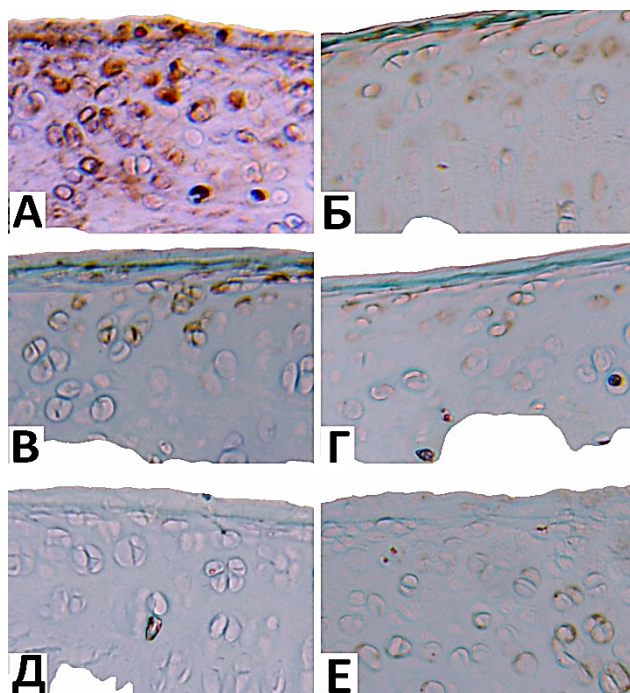


Рис. 2. Интактный суставной хрящ, окраска ДАВ-хромогеном: А – агрекан, В – лубрицин, Д – ИЛ-1. Суставной хрящ через 3 недели после внутрисуставного введения, окраска ДАВ-хромогеном: Б – агрекан, Г – лубрицин, Е – ИЛ-1, x200

Безусловно, полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего изучения САБС при ремоделировании суставного хряща в условиях ОА коленного сустава, а также в перспективе для вискоасплементарной терапии [9, 10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования пространственного распределения агрекана и лубрицина в норме и после внутрисуставного введения САБС было выявлен интересный факт. В суставном хряще после внутрисуставного введения САБС не изменяется пространственное распределение протеогликанов, но снижается доля иммунопозитивных хондроцитов к агрекану в промежуточной зоне и возрастает доля к ИЛ-1.

При этом экспрессия лубрицина хондроцитами поверхностной зоны суставного хряща не изменяется.

Полученные данные в дальнейшем можно будет использовать для расширения представлений о структурно-функциональных особенностях суставного хряща в условиях моделируемого экспериментального остеоартроза и изучения эффективности модификатора синовиальной жидкости на основе белков сурфактанта.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Портянникова О.О., Цвингер С.М., Говорин А.В., Романова Е.Н. Анализ распространенности и факторов риска развития остеоартрита в популяции. *Современная ревматология*. 2019;13(2):105–111. (In Russ.) doi: 10.14412/1996-7012-2019-2-105-111.
2. Boer C.G., Hatzikotoulas K., Southam L. et al. Deciphering osteoarthritis genetics across 826,690 individuals from 9 populations. *Cell*. 2021;184(18):4784–818. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.07.038>.
3. Abujaber S., Altubasi I., Hamdan M., Al-Zaben R. Impact of end-stage knee osteoarthritis on perceived physical function and quality of life: a descriptive study from Jordan. *PloS One*. 2023;18(6):e0286962. doi: 10.1371/journal.pone.0286962.
4. De Marziani L., Sangiorgio A., Bensa A. et al. Intra-articular injections in sport-active patients with degenerative cartilage lesions or osteoarthritis of the knee: a systematic review. *Journal of experimental orthopaedics*. 2023;10(1):112. doi: 10.1186/s40634-023-00674-0.
5. Krylov P.A., Tretyakova A.V., Gerasimova E.O. et al. Evaluation of structural homology between functionally similar proteins of highly specialized tissues on the example of proteoglycans and surfactant proteins. *Journal of Bioinformatics and Genomics*. 2023;1(19):1–12. doi: 10.18454/jbg.2023.3.19.001
6. Li Z., Lu J. CircRNAs in osteoarthritis: research status and prospect. *Front Genet*. 2023;14:1173812. doi: <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1173812>.
7. Knudson W., Ishizuka S., Terabe K., et al. The pericellular hyaluronan of articular chondrocytes. *Matrix Biol*. 2019;78–79:32–46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.005>.
8. Huang L., Zhang S., Wu J. et al. Immunity-and-matrix-regulatory cells enhance cartilage regeneration for meniscus injuries: a phase I dose-escalation trial. *Signal transduction and targeted therapy*. 2023;8(1):417. doi: 10.1038/s41392-023-01670-7.
9. De Leon-Oliva D., Boaru D.L., Perez-Exposito R.E. et al. Advanced Hydrogel-Based Strategies for Enhanced Bone and Cartilage Regeneration: A Comprehensive Review. *Gels (Basel, Switzerland)*. 2023;9(11):885. doi: 10.3390/gels9110885.
10. Lu Z., Xie L., Liu W. et al. A bibliometric analysis of intra-articular injection therapy for knee osteoarthritis from 2012 to 2022. *Medicine*. 102(46):e36105. doi: 10.1097/MD.00000000000036105.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Павел Андреевич Крылов – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и биоинженерии, Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия; ✉ krylov.pavel@volsu.ru

Ирина Михайловна Романова – студентка кафедры биологии и биоинженерии, Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия; romanova-i@vfanc.ru

Екатерина Дмитриевна Великанова – студентка кафедры биологии и биоинженерии, Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия; velikanova-e@vfanc.ru

Полина Алексеевна Зыбинская – студентка кафедры биологии и биоинженерии, Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия; zybinskaya-pa@vfanc.ru

Алия Аликовна Абдулова – студентка кафедры биологии и биоинженерии, Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия; abdulova-aa@vfanc.ru

Валерий Леонидович Загребин – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; vlzagrebin@gmail.com

Валерий Валерьевич Новочадов – доктор медицинских наук, профессор кафедры биологии и биоинженерии, Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия; novovv@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 02.06.2023; одобрена после рецензирования 19.09.2023; принята к публикации 28.11.2023.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Pavel A. Krylov – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Biology and Bioengineering, Volgograd State University, Volgograd, Russia; ✉ krylov.pavel@volsu.ru

Irina M. Romanova – student of the Department of Biology and Bioengineering, Volgograd State University, Volgograd, Russia; romanova-i@vfanc.ru

Ekaterina D. Velikanova – student of the Department of Biology and Bioengineering, Volgograd State University, Volgograd, Russia; velikanova-e@vfanc.ru

Polina A. Zybinskaya – student of the Department of Biology and Bioengineering, Volgograd State University, Volgograd, Russia; zybinskaya-pa@vfanc.ru

Aliya A. Abdulova – student of the Department of Biology and Bioengineering, Volgograd State University, Volgograd, Russia; abdulova-aa@vfanc.ru

Valery L. Zagrebin – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Histology, Embryology, Cytology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; vlzagrebin@gmail.com

Valery V. Novochadov – Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Biology and Bioengineering, Volgograd State University, Volgograd, Russia; novovv@rambler.ru

The article was submitted 02.06.2023; approved after reviewing 19.09.2023; accepted for publication 28.11.2023.