

ВОЗДЕЙСТВИЕ ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЕ ПРЕХОНДРОБЛАСТОВ

А. ТОРГОМЯН^{1*}, С. АДАМЯН¹, А. ГАМБАРЯН¹, А. АСРАТЯН¹, Д. ХУДАВЕРДЯН¹, Ч. АРЧЕР²

¹ Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци
E-mail: adelinatorgomyan@yahoo.com

² Университет Суонси Уэльс, Singleton Park, Swansea, Wales SA2 8PP, Великобритания
E-mail: c.archer@swansea.ac.uk

Паратиреоидный гормон (ПТГ) обладает как анаболическим эффектом, который наблюдается при периодическом воздействии гормона, так и катаболическим в результате длительного постоянного воздействия высоких доз, наблюдаемым при определенных патологических состояниях, в частности, при гиперфункции паращитовидных желез. Целью настоящего исследования является изучение воздействия периодического и постоянного введения фрагмента 1–34 ПТГ на дифференциацию бычьих прехондробластов, содержащихся в хондрогенной и остеогенной среде. При исследовании монослойных культур клеток, содержащихся в хондрогенной среде, окрашиванием Alcian blue установлено, что постоянное добавление ПТГ стимулирует хондрогенез, проявляющийся более интенсивным окрашиванием матрикса. При изучении монослойных культур клеток, содержащихся в остеогенной среде, окрашиванием Alizarin red обнаружена сравнительно более интенсивная минерализация матрикса в чашках, где клетки содержались с периодическим добавлением ПТГ. Данные гистохимического исследования подтверждаются проведенной электрофоретической детекцией остеокальцина и коллагена 2-го типа.

Ключевые слова: паратиреоидный гормон, хондробласт, дифференциация, хондрогенез.

Введение. Паратиреоидный гормон (ПТГ) — основной регулятор гомеостаза кальция и фосфора в организме — осуществляет свое регуляторное влияние по принципу обратной связи через ряд органов-мишеней, одним из которых является костная ткань, главное депо ионов кальция. Паратиреоидный гормон человека — это пептид состоящий из 84 аминокислот (ПТГ 1–84), который вместе с активным фрагментом 1–34 (терипаратид) в зависимости от продолжительности воздействия имеет контрастное влияние на костную ткань. В целом действие гормона на кость реализуется цАМФ-зависимым меха-

низмом через систему остеобласты — остеоциты — остеокласты, последовательная двухфазная (быстрая и медленная фазы) активация клеточных элементов которых завершается резорбцией костного матрикса с вымыванием кальциево-фосфатных солей из аморфных кристаллов кости и их поступлением во внеклеточную жидкость и кровь с последующей гиперкальциемией. Непрерывное длительное воздействие ПТГ приводит к замедлению образования костной ткани, в то время как периодическое — стимулирует синтез коллагена и костеобразование. Выявлено, что периодическое введение ПТГ активирует регенерацию, а следовательно, приводит к увеличению губчатой и кортикальной костной массы, повышая механическую прочность и костно-минеральную плотность.

Таким образом, воздействие ПТГ может рассматриваться и как «анаболический» эффект, который наблюдается при периодическом воздействии ПТГ, и как «катаболический» в результате длительного, постоянного воздействия высоких доз, наблюдаемого при определенных патологических состояниях, в частности при гиперфункции околощитовидных желез. Положительные «анаболические» эффекты ПТГ на метаболизм костной ткани впервые описаны в начале 30-х годов прошлого столетия Pugsley et al. [1], однако подробные исследования стали возможными лишь после успешного химического синтеза фрагмента 1–34 ПТГ человека в 70-х годах [2]. Упомянутые результаты в дальнейшем подтверждаются рядом современных исследований, которыми было доказано, что ПТГ (1–34) способствует увеличению массы трабекулярной и кортикальной костной ткани у людей, в результате чего наблюдается значительное повышение общей массы скелета. Дозозависимое

увеличение массы костной ткани описано в первую очередь при исследовании воздействия фрагмента 1–34 на массу проксимального отдела большеберцовой кости, бедра (проксимальная часть, диафиз, дистальная часть) и поясничных позвонков, а впоследствии подтверждено при исследовании массы черепа, грудного и шейного отделов позвоночника, костей голени, плеча и предплечья [3, 4].

Однако несмотря на ряд исследований, посвященных изучению воздействия ПТГ на процессы пролиферации и дифференциации клеток, влияние различных дозировок ПТГ 1–34 на дифференциацию бычьих прехондробластов до сих пор остается недостаточно изученным.

Целью настоящего исследования явилось изучение воздействия периодического и непрерывного введения фрагмента 1–34 ПТГ на дифференциацию бычьих прехондробластов, содержащихся в хондрогенной и остеогенной средах.

Материалы и методы. *Выделение прехондробластов из гиалинового хряща.* Гиалиновый хрящ с поверхности мышечков бычьих бедренных костей подвергали последовательному воздействию ферментов проназы (70 ЕД/мл^{-1} , 1 ч при 37°C) и коллагеназы (300 ЕД/мл^{-1} , 3 ч при 37°C). Выделенные клетки культивировали в чашках, предварительно покрытых фибронектином («Sigma», ОК). Через 20 мин при 37°C среду с неадгезированными клетками удаляли и замещали новой питательной средой, содержащей DMEM, пенициллин $10\,000 \text{ мг/мл}^{-1}$, стрептомицин $10\,000 \text{ ЕД/мл}^{-1}$, $0,1 \text{ мМ}$ аскорбиновую кислоту, 100 мМ HEPES и 10%-ную фетальную телячью сыворотку. Для стимулирования хондрогенеза в среду добавляли ITS («Gibco», ОК) и TGF- β (TGF- β 2; «PeproTech», ОК), а с целью исследования остеогенеза клетки содержали в среде с добавлением β -глицерофосфата. Питательную среду замещали новой каждый второй день. При изучении эффекта непрерывного воздействия фрагмент 1–34 добавляли в среду при каждой ее замене, а при исследовании периодического – через одну смену среды. При этом расчетная доза составляла 100 нг ПТГ на 1 мл среды.

Иммуно-гистохимическое исследование монослойных культур прехондробластов. С целью выявления хондрогенеза использовали Alcian blue,

окрашивающий кислые гликозаминогликаны, которые характерны для хрящевого матрикса. При определении остеогенеза использовали Alizarin red, выявляющий очаги кальцификации и являющийся маркером минерализации матрикса. Результаты исследования оценивали методом фазово-контрастной микроскопии с помощью микроскопа (Eclipse E800; Nikon) и встроенной камеры (2000R Fast1394; Retiga).

ПЦР-анализ осуществляли для определения воздействия непрерывного и периодического введения ПТГ на уровень экспрессии маркерных генов в однослойных культурах бычьих прехондробластов – маркера хондрогенеза (коллаген 2-го типа) и остеогенеза (остеокрин). При этом клетки промывали PBS, а затем замораживали в жидком азоте. Эксплантаты гомогенизировали в присутствии 1 мл замороженного TRI реагента (Sigma) с использованием Mikro-Dismembrator U (B. Braun Biotech International, Melsungen, Германия) с последующей экстракцией РНК. Ресуспендировали РНК в обработанной диэтилпиноксикарбонатом воде, затем обрабатывали DNase1 («Promega», США) и определяли количество ее с помощью УФ-спектрофотометрии. Выделенную РНК (200 нг) подвергали обратной транскрипции с последующей электрофоретической детекцией продуктов транскрипции для определения активности целевых генов, используя стандартные протоколы молекулярной биологии.

Результаты исследования. Изучение монослойных культур прехондробластов в фазово-контрастном микроскопе позволило выявить колонии клеток уже на 3-й день после посева (рис. 1, а). Выявлена фибробластоподобная структура клеток с многочисленными отростками, характерная для прехондробластов, адгезированных к гладкой поверхности. К 10-му дню клетки достигали конfluence, что позволяло продолжить эксперимент по выделению РНК и обратной транскрипции для последующей ПЦР (рис. 1, б).

Кроме того, было осуществлено соответствующее гистологическое окрашивание фиксированных монослойных культур. Так, при окрашивании Alcian blue культур клеток, содержащихся в хондрогенной среде с периодическим (рис. 2, а) и постоянным (рис. 2, б) добавлением ПТГ, невооруженным глазом ка-

ких-либо изменений не выявлено. Однако при рассмотрении под микроскопом оказалось, что постоянное добавление ПТГ стимулирует в некоторой степени хондрогенез, что проявляется более интенсивным окрашиванием матрикса. При изучении монослойных культур клеток, содержащихся в остеогенной среде с периодическим и постоянным добавлением ПТГ, на 10-й день при окрашивании Alizarin red обнаружена более интенсивная минерализация матрикса в чашках, где клетки содержались с периодическим добавлением ПТГ (рис. 3, *a*). В монослойных культурах клеток, содержащихся в хондрогенной среде с периодическим введением ПТГ, на 15-й день посева обнаружены очаги кальцификации матрикса, которые видны даже в неокрашенных культурах. При окрашивании Alizarin red указанные очаги можно было наблюдать невооруженным глазом. При этом в контрольных чашках без добавления ПТГ депозитов кальцификатов не было. Под микроскопом участки минерализации были более явственными (рис. 3, *b*) и свидетельствовали об остеогенной дифференциации прехондробластов.

При проведении ПЦР в результате обратной транскрипции РНК и гель-электрофореза полученной ДНК выявлена активность коллагена 2-го типа в клетках, содержащихся в хондрогенной среде с постоянным добавлением ПТГ, и активность остеокина в клетках, содержащихся в остеогенной среде с периодическим добавлением ПТГ, что подтверждает результаты гистохимического анализа монослойных культур.

Обсуждение полученных данных. Согласно литературным данным анаболическое или катаболическое воздействие ПТГ (1–34) на костную ткань зависит от его дозирования. Периодическое воздействие в виде подкожных инъекций раз или два в день приводит к стимуляции образования костной ткани и преобладанию процессов синтеза над резорбцией, в результате чего наблюдается увеличение костной массы [4]. В отличие от этого при непрерывном введении увеличивается содержание кальция в сыворотке крови как человека [5], так и крыс [6], что свидетельствует о преобладании процессов резорбции кости с подавлением формирования новой костной ткани, в результате чего на-

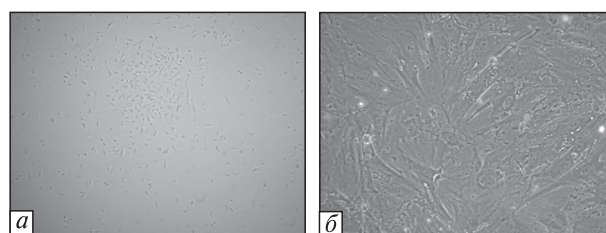


Рис. 1. Колония клеток на 3-й (*a*) и 10-й (*b*) день. Ув. $\times 40$

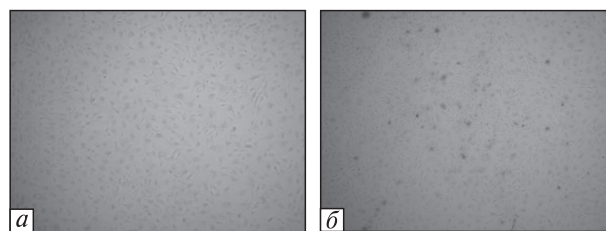


Рис. 2. Прехондробласты, периодическое (*a*) и постоянное введение (*b*) ПТГ, хондрогенная дифференциация, окраска Alcian blue. Ув. 40

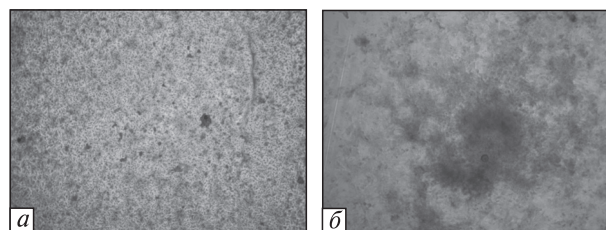


Рис. 3. Прехондробласты, периодическое введение ПТГ, остеогенная дифференциация, остеогенная среда (*a*) и хондрогенная среда (*b*), окраска Alizarin red. Ув. 40

блюдается снижение костной массы. Так, одночасовая инфузия крыс ПТГ (1–34) приводила к увеличению количества остеобластов и активации костеобразования в проксимальной части метафиза большеберцовой кости, в то время как двухчасовые и более длительные инфузионные периоды приводили к увеличению уровня кальция в сыворотке крови, а соответственно, индуцировали избыточную костную резорбцию [6]. Frolik et al. [7] в своих исследованиях показали, что однофазовая и постоянная инфузия ПТГ (1–34) приводила к активации процессов метаболизма в костной ткани, при этом кратковременное воздействие гормона проявлялось его анаболическим

эффектом, а продолжительное воздействие приводило к преобладанию катаболических процессов, что являлось следствием длительного повышения уровня ПТГ (1–34) в сыворотке крови.

Kudo et al. [8] представили исследование, проведенное на кроликах, согласно которому непрерывное и краткосрочное введение ПТГ успешно индуцировало хондрогенез в репаративной ткани в области 5-мм дефектов суставного хряща в полную его толщину. Они также показали, что у животных, подвергнутых периодическому воздействию ПТГ, происходило восстановление области дефекта суставного хряща гиалиновой тканью, аналогичное воздействию фактора роста фибробластов – FGF-2.

Liu et al. [9] провели исследование воздействия периодического и непрерывного введения ПТГ на пролиферацию хондроцитов и их дифференциацию в остеогенной среде *in vitro* и доказали, что периодическое введение способствовало дифференциации хондроцитов и эндохондральному остеогенезу, в то время как непрерывное введение активировало пролиферацию хондроцитов и одновременно подавляло их дифференциацию в остеоциты.

Кроме того, фрагмент 1–34 ПТГ оказывает непосредственное влияние на мезенхимальные стволовые клетки, хондроциты и остеобласты в течение эндохондральной регенерации костной ткани [10]. Какар et al. [11] в исследованиях модели закрытого перелома бедренной кости мышей обнаружили, что ПТГ (1–34) преимущественно активирует хондрогенез сильнее, чем остеогенез. Активация хондрогенеза приводит к ускорению образования хрящевого матрикса в ранней фазе репарации переломов. Впоследствии ПТГ (1–34) активирует дифференциацию хондроцитов и минерализацию костной мозоли, о чем свидетельствует раннее повышение экспрессии Sox9 и соответственно ранняя индукция синтеза коллагена X-типа.

Таким образом, согласно данным проведенного нами гистохимического исследования и ПЦР-анализа постоянное введение ПТГ в питательную среду стимулирует хондрогенез лишь в небольшой степени, в то время как периодическое добавление ПТГ стимулирует остеогенез и минерализацию матрикса, что наблюдается даже в хондрогенной среде.

Настоящее исследование осуществлено в Университете Суонси (Великобритания) при поддержке проф. Ч. Арчера и финансировано Университетом Суонси, ЕГМУ и Государственным комитетом по науке Министерства образования и науки Армении (тематическое финансирование 13-3A042).

PARATHYROID HORMONE INFLUENCE ON CHONDROGENIC PROGENITOR CELLS DIFFERENTIATION

A. Torgomyan, S. Adamyan, H. Ghambaryan, H. Hasratyan, D. Khudaverdyan, C. Archer

Yerevan State Medical University
aft. M. Heratci, Armenia
E-mail: c.archer@swansea.ac.uk
Swansea University, UK

The anabolic effects require brief exposures to higher than average PTH concentrations. The catabolic effects result from pathological conditions in which parathyroid glands secrete too much hormone continuously at a sustained level. The aim of the present study was observance of intermittent (I-PTH) and continuous (C-PTH) PTH 1-34 administration influence on bovine chondrogenic progenitor cells (CPC) differentiation. Alcian blue was used to determine proteoglycan accumulation in CPC monolayer cultures. Thus in plates containing CPCs in C-PTH media chondrogenic differentiation was indicated by intensive proteoglycan accumulation in extracellular matrix. CPCs monolayer cultured in osteogenic media were subjected to Alizarin Red staining for matrix mineralization detection. Intense staining was revealed in I-PTH cells in comparison with C-PTH plates. The data obtained by monolayer cultures histological staining were confirmed by PCR analysis.

ВПЛИВ ПАРАТИРЕОЇДНОГО ГОРМОНА НА ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ПРЕХОНДРОБЛАСТІВ

A. Торгомян, С. Адамян, А. Гамбарян, А. Асратян, Д. Худавердян, Ч. Арчер

Паратиреоїдний гормон (ПТГ) здійснює як анаболічний вплив, який спостерігається при періодичній дії гормону, так і катаболічний в результаті тривалої постійної дії високих доз, що спостерігаються при певних патологічних станах, зокрема, при гіперфункції паращитоподібних залоз. Метою цього дослідження є вивчення впливу періодичного і постійного введення фрагмента 1–34 ПТГ на диференціацію бичачих прехондробластів в хондрогенному та остеогенному середовищі. При дослідженні моношарових культур клітин, що містяться в хондрогенному середовищі, фарбуванням Alcian blue

встановлено, що постійне додавання ПТГ стимулює хондрогенез, який проявляється більш інтенсивним фарбуванням матриксу. При вивченні моношарових культур клітин, що містяться в остеогенному середовищі, фарбуванням Alizarin red виявлено порівняно більш інтенсивну мінералізацію матриксу в чашках з періодичним додаванням ПТГ. Дані гістохімічного дослідження підтверджуються проведеною електрофоретичною детекцією остеокрина і колагена 2-го типу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pugsley, L.I., and Selye, H., The histological changes in the bone responsible for the action of parathyroid hormone on the calcium metabolism of the rat, *J. Physiol.*, 1933, vol. 79, no. 1, pp. 113–117.
2. Parsons, J.A., Parathyroid physiology and the skeleton, *Biochemistry and physiology of bone*. Vol. 4, ed. G.H. Bourne, New York, Acad. Press, 1976, pp. 271–298.
3. Dempster, D.W., Cosman, F., Parisien, M., Shen, V., and Lindsay, R., Anabolic actions of parathyroid hormone on bone, *Endocr. Rev.*, 1993, vol. 14, no. 6, pp. 690–709.
4. Sato, M., Zeng, G.Q., and Turner, C.H., Biosynthetic human PTH (1-34) effects on bone quality in aged ovariectomized rats, *Endocrinology*, 1997, vol. 138, no. 10, pp. 4330–4337.
5. Cosman, F., Shen, V., Herrington, B., and Lindsay, R., Response of the parathyroid gland to infusion of parathyroid hormone-(1–34): demonstration of suppression of endogenous secretion using immunoradiometric intact PTH-(1-84) assay, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1991, vol. 73, no. 10, pp. 1345–1351.
6. Dobnig, H., and Turner, R.T., The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1–34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats, *Endocrinology*, 1997, vol. 138, no. 11, pp. 4607–4612.
7. Frolik, C.A., Black, E.C., Cain, R.L., Satterwhite, J.H., Brown-Augsburger, P.L., Sato, M., and Hockb, J.M., Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1-34) are predicted by duration of hormone exposure, *Bone*, 2003, vol. 33, no. 3, pp. 372–379.
8. 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. 886–894.
9. Liu, Q., Wana, Q., Yang, R., Zhou, H., and Li, Z., Effects of intermittent versus continuous parathyroid hormone administration on condylar chondrocyte proliferation and differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, vol. 424, no. 1, pp. 182–188.
10. Okazaki, K., Jingushi, S., Ikenoue, T., Urabe, K., Sakai, H., and Iwamoto, Y., Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing, *J. Orthop. Res.*, 2003, vol. 21, no. 3, pp. 511–520.
11. Kakar, S., Einhorn, T.A., Vora, S., Miara, L.J., Hon, G., Wigner, N.A., Toben, D., Jacobsen, K.A., Al-Sebaei, M.O., Song, M., Trackman, P.C., Morgan, E.F., Gerstenfeld, L.C., and Barnes, G.L., Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures, *J. Bone Miner. Res.*, 2007, vol. 22, no. 12, pp. 1903–1912.

Поступила 31.05.15