

Автономная научная некоммерческая организация высшего образования  
Научно-исследовательский центр  
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»



*На правах рукописи*

**МЯКИШЕВА**

**Светлана Николаевна**

**ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И  
СТАРЕНИЯ ХОНДРОЦИТОВ**

3.1.31 – геронтология и гериатрия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

заслуженный деятель науки РФ,  
доктор медицинских наук, профессор  
Рыжак Галина Анатольевна

Санкт-Петербург – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением: роль в патогенезе остеоартрита и перспективы пептидной биорегуляции.....	14
1.1.1. Молекулы, формирующие SASP хондроцитов, и участвующие в патогенезе остеоартрита.....	23
1.1.1.1. Факторы транскрипции, апоптоза и маркеры клеточного старения.....	23
1.1.1.2. Сиртуины.....	25
1.1.1.3. Ферменты антиоксидантной системы.....	26
1.1.1.4. Цитокины.....	26
1.1.1.5. Матриксные металлопротеиназы.....	29
1.1.1.6. Оксид азота.....	30
Заключение к разделу 1.1. ....	31
1.2. Пептидная регуляция хондрогенной дифференцировки стволовых клеток.....	33
1.2.1. Дифференцировка хондроцитов человека.....	34
1.2.2. Факторы хондрогенеза мезенхимальных стволовых клеток.....	37
1.2.3. Пептиды, стимулирующие хондрогенную дифференцировку.....	41
Заключение к разделу 1.2. ....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.1. Дизайн эксперимента. Характеристика исследуемых клеточных линий.....	48
2.2. Построение кривой клеточного роста.....	50
2.3. Полимеразная цепная реакция.....	50
2.4. Иммуноцитохимическое исследование и морфометрия .....	51

2.5. Статистическая обработка данных .....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.1. Влияние пептидов на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых крыс.....	53
3.2. Влияние пептидов на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток человека при репликативном старении .....	57
3.3. Влияние пептидов на формирование секреторного фенотипа хондроцитов, ассоциированного со старением .....	64
3.4. Обсуждение.....	67
ВЫВОДЫ .....	73
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	75
ЛИТЕРАТУРА.....	76

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК	Активные формы кислорода
ВКМ	Внеклеточный матрикс
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
КМ-МСК	Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга
КС	Кондиционированная среда
ЛФК	Лечебная физкультура
МСК	Мезенхимальные стволовые клетки
мтДНК	Митохондриальная ДНК
НПВС	Нестероидные противовоспалительные средства
ОА	Остеоартрит
ПКСМ	Плюрипотентные клетки скелетогенной мезенхимы
ППКХ	Полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
П-МСК	Мезенхимальные стволовые клетки послеродовой плаценты
ТФ	Транскрипционные факторы
АСАН	Агрекан
АСІ	Метод имплантации аутологичных хондроцитов
АЕD	Пептид H-Ala-Glu-Asp-H
Alpl	Ген, кодирующий тканенеспецифическую щелочную фосфатазу
АМРК	5'-АМР-активированный белок киназа
ВСL	Ген фолликулярной лимфомы
bFGF	Основной фактор роста фибробластов
Bmal	Ген-регулятор циркадных ритмов
ВМР	Морфогенетический белок кости
Bsp	Костный сиалопротеин
ССL	Хемотаксический фактор
CD	Кластер дифференцировки

СМР	Пептиды-миметики коллагена
Col	Коллаген
COMP	Олигомерный матричный белок хряща
COX	Простациклиновый путь
CX3CL	Хемокин лиганд 3
ERK	Внеклеточная сигнал-регулируемая киназа
GDF	Трансформирующий ростовой фактор
HLA-DR	Человеческий лейкоцитарный антиген, сублокус DR
IGF	Инсулиноподобный фактор роста
IL	Интерлейкин
iNOS	Индукцируемая синтаза оксида азота
JNK	Киназа N-концевой части фактора транскрипции Jun
KPNA	Субъединица кариоферина Альфа 1
LAG	Ген активации лимфоцитов
MAPK	Активируемая митогеном протеинкиназа
Matn	Матрилин
MEF	Миоцит-специфический энхансерный фактор
miR	Микро-РНК
MMP	Матриксные металлопротеиназы
NF-κB	Ядерный фактор каппа-энхансер легкой цепи активированных В-клеток
NO	Оксид азота
PCNA	Ядерный антиген пролиферирующих клеток
PEODA	Диакрилат полиэтиленоксида
PGE	Простагландин
PI3K	Фосфатидилинозитол-3-киназа
pRb	Ретинобластома
RANKL	Активатор рецептора NF-κB
RUNX (CBF)	Кор-связывающие факторы

SASP	Секреторный фенотип, ассоциированный со старением
SIPS	Преждевременное старение, вызванное стрессом
SIRT	Сиртуин
SOD	Супероксиддисмутаза
STAT	Статин
TCF/LEF	T-клеточный фактор/лимфоидный усиливающий фактор
TGF	Трансформирующий фактор роста
TIMP	Ингибитор металлопротеиназы
TNF	Фактор некроза опухоли
TNFR	Рецептор фактора некроза опухоли
TOR	Орфанный рецептор тимуса
TRAF2	Фактор 2, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли
Treg	Регуляторные Т-клетки
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Патология опорно-двигательного аппарата является одной из наиболее часто встречающихся у лиц пожилого и старческого возраста. Известно, что остеоартрит (ОА) встречается у 60% лиц старше 60 лет и у 80% людей старше 75 лет. ОА приводит к нарушению двигательной активности, необходимости эндопротезирования и, в конечном итоге, к социальной дезадаптации и инвалидизации [Шукурова С.М., Хамроева З.Д., Почоджанова Ш.Ш., и др., 2015]. Поиск эффективных и безопасных пептидных биорегуляторов для нормализации функций хрящевой ткани у лиц старших возрастных групп является актуальной задачей биогеронтологии [Khatri S., Hansen J., Pedersen N.B., et al., 2022.; Wenhart C., Holthoff H.P., Reimann A., et al., 2021]. Перспективными геро- и хондропротекторами являются полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей (ППКХ) и пептид AED (H-Ala-Glu-Asp-N), входящий в его состав.

ППКХ и входящий в его состав трипептид AED показали высокую эффективность в экспериментальных моделях заболеваний опорно-двигательного аппарата (ОА, остеопороз, остеохондроз и др.) *in vivo*. Пептид AED нормализовал плотность костной ткани при остеопорозе за счет регуляции функции кальцитонинпродуцирующих клеток щитовидной железы. Механизмом действия ППКХ и пептида AED является их способность снижать синтез проапоптотического белка p53 и повышать синтез белка пролиферации PCNA в хондроцитах [Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х. и др., 2019]. Молекулярный механизм хондропротекторной активности пептидов при клеточном старении в настоящее время не изучен. В связи с этим изучение влияния ППКХ и пептида AED на функциональную активность хондроцитов при старении *in vitro* является актуальной задачей биогеронтологии.

## **Цель и задачи исследования**

Целью исследования явилось изучение влияния полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, а также секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением (SASP).

Задачи:

1. Оценить влияние полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых крыс.

2. Оценить влияние полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на экспрессию генов хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека *SOX9*, *COL2A1*, *COMP*, *ACAN*.

3. Изучить влияние полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на синтез белков хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека *SOX9*, агрекана, коллагена II типа, олигомерного матричного белка хряща *COMP*; полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением (SASP): p16, p53, p21, сиртуин *SIRT1*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\alpha$* .

4. Провести сравнительную оценку влияния полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на дифференцировку и старение хондроцитов.

5. Выявить основные молекулярные мишени геропротекторного действия полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и пептида AED на хондроциты при старении *in vitro*.

## **Степень разработанности темы исследования**

Основой для данного диссертационного исследования послужило актуальное направление молекулярной биологии и геронтологии,



посвященное поиску эффективных и безопасных пептидных биорегуляторов для нормализации функций хрящевой ткани у лиц старших возрастных групп [Khatri S., Hansen J., Pedersen N.B., et al., 2022.; Wenhart C., Holthoff H.P., Reimann A., et al., 2021]. В настоящее время разрабатываются методы биоинженерии, способные стимулировать восстановление хрящевой ткани. Заболевания опорно-двигательного аппарата, включая ОА, являются одной из ведущих причин инвалидизации лиц среднего и пожилого возраста во всем мире. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии был разработан ППКХ крупного рогатого скота - регулятор репарации хрящевой и костной тканей [Khavinson V.Kh., Grigoriev E.I., Malinin V.V., et al., 2008]. В настоящее время в рамках II фазы клинических испытаний проводится оценка его эффективности и безопасности у больных гонартрозом второй и третьей степени [Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х., 2019]. Это свидетельствует о перспективности исследования ППКХ в качестве вещества, которое потенциально может быть эффективно при ОА и обладать геропротекторными свойствами. В состав ППКХ входят короткие пептиды, в том числе пептид AED [Журкович И.К., Ковров Н.Г., Рыжак Г.А., и др., 2020].

### **Научная новизна**

В работе впервые показано, что пептид AED в эффективной концентрации 200 нг/мл повышал количество хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,4-1,8 и 1,6-2,1 раза по сравнению с контролем. ППКХ в эффективной концентрации 2000 нг/мл стимулировал пролиферацию хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,7-2,2 и 1,8-2,5 раза по сравнению с контролем.

Впервые изучено влияние ППКХ и пептида AED на экспрессию генов SOX9, COL2A1, COMP, ACAN и синтез белков хондрогенной дифференцировки SOX9, аггрекана, коллагена II типа и COMP в культуре

МСК человека при репликативном старении. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл активирует экспрессию генов и синтез всех исследуемых белков при старении МСК. Для ППКХ этот эффект достигается в концентрации 2000 нг/мл.

Впервые охарактеризован SASP хондроцитов и проведена сравнительная оценка влияния пептида AED и ППКХ на этот показатель. Установлено, что SASP хондроцитов характеризуется повышением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , и снижением синтеза SIRT1. Впервые установлено, что пептиды AED и ППКХ нормализуют синтез молекул, формирующих секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением. Установлено, что молекулярные механизмы геро- и хондропротекторного действия ППКХ и пептида AED обусловлены снижением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и повышением экспрессии гистоновой деацетилазы SIRT1 в хондроцитах.

### **Практическая значимость**

Исследование влияния ППКХ и пептида AED на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых крыс, на экспрессию генов и синтез белков хондрогенной дифференцировки МСК человека, а также влияния ППКХ и пептида AED на SASP хондроцитов позволило установить, что ППКХ и пептид AED обладают геро- и хондропротекторными свойствами в исследованиях *in vitro*. Эти эффекты пептидов достигаются за счет снижения синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и увеличения экспрессии фермента SIRT1, регулирующего активность транскрипционных факторов в хондроцитах. Полученные результаты демонстрируют перспективы применения изученных веществ в качестве хондро- и геропротекторных препаратов нового

поколения, эффективно стимулирующих репарацию хрящевой ткани при ее старении и ассоциированных с возрастом заболеваниями, в том числе ОА.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Пептид AED в эффективной концентрации 200 нг/мл повышает количество хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,4-1,8 и 1,6-2,1 раза по сравнению с контролем. Полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в эффективной концентрации 2000 нг/мл стимулирует пролиферацию хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс, соответственно в 1,7-2,2 и 1,8-2,5 раза по сравнению с контролем.
2. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл активирует экспрессию генов SOX9, COL2A1, COMP, ACAN и синтез белков SOX9, коллагена II типа, COMP, агрекана хондрогенной дифференцировки при старении мезенхимальных стволовых клеток. Для полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей этот эффект достигается в концентрации 2000 нг/мл.
3. Секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением, характеризуется повышением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , и снижением синтеза SIRT1. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей нормализуют синтез молекул, формирующих SASP хондроцитов.
4. Полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей и пептид AED обладают геро- и хондропротекторными свойствами, обусловленными снижением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и повышением экспрессии гистоновой деацетилазы SIRT1 в хондроцитах.

### **Связь с научно-исследовательской работой института**

Диссертационная работа является темой, выполняемой по основному плану НИР АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии».

### **Соответствие диссертации заявленной специальности**

Диссертация «Пептидная регуляция дифференцировки и старения хондроцитов» соответствует паспорту специальности 3.1.31. Геронтология и гериатрия, и областям исследования: пункту 2 - Изучение процессов формирования биологического и хронологического возраста, старения и старости. Основные механизмы физиологического, преждевременного, патологического старения, а также пункту 4 - Разработка принципов профилактической геронтологии и гериатрии, методов и средств профилактики преждевременного старения. Обоснование принципов, разработка методов и средств увеличения продолжительности жизни и продления активного периода жизни.

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликованы 10 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований и международных журналах, входящих в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, 1 статья в сборнике и 5 тезисов докладов.

### **Апробация и реализация диссертации**

Основные результаты диссертационного исследования были доложены на XV Научно-практической конференции «Пушковские чтения – 2019. Актуальные вопросы геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2019); на IV международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии» (Сочи, 2021); на XV Международном

форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2022); на Юбилейной научно-практической конференции «ИЭПиТ 2022. Вчера, сегодня, завтра» (Сухум, Абхазия, 2022); на III Санкт-Петербургском геронтологическом форуме «Развитие Российской геронтологии и приоритеты государственной политики в сфере медико-социальной поддержки граждан старшего поколения» (Санкт-Петербург, 2023); на мини-конференции с международным участием «Антимикробные пептиды как прототипы новых антибиотиков» (Санкт-Петербург, 2023); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2023» (Москва, 2023).

### **Личный вклад автора**

Автором лично определены цель и задачи исследования, проанализирована отечественная и зарубежная литература по изучаемой проблеме, разработаны методические подходы к проведению исследования. Автор самостоятельно производила культивирование клеток, построение кривых клеточного роста, выполняла постановку ПЦР-реакции, иммуноцитохимическое исследование, морфометрию, статистическую обработку и обобщение полученных материалов, подготовку всех публикаций по теме диссертационной работы, написание и оформление рукописи.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 91 странице, содержит 15 рисунков, 2 таблицы. Список литературы содержит 135 источников, из них на русском языке – 14, на английском языке – 121.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Секреторный фенотип хондроцитов, ассоциированный со старением: роль в патогенезе остеоартрита и перспективы пептидной биорегуляции

Остеоартрит (ОА) является наиболее распространенной формой артрита и представляет собой заболевание синовиальных суставов у лиц старших возрастных групп, которое характеризуется деградацией хряща и разрастанием кости в виде остеофитов и субхондральных утолщений. ОА сопровождается выраженным болевым синдромом и приводит к инвалидизации. Существует ряд факторов риска развития ОА: предшествующая травма сустава, ожирение, генетическая предрасположенность, пол, анатомические факторы, связанные с формой и расположением суставов. Однако наиболее значимым фактором риска развития ОА является возраст старше 60 лет [Greene M.A., Loeser R.F., 2015]. В связи с этим важной задачей клеточной и молекулярной геронтологии является разработка эффективных и безопасных хондропротекторов для терапии ОА.

Клеточное старение представляет собой сложный процесс, включающий метаболическую, морфологическую и физиологическую трансформацию клеток в ответ на оксидативный стресс и другие факторы [van Deursen J.M., 2014]. Сенесцентные клетки могут оказывать воздействие на свое микроокружение. Это явление описано как секреторный фенотип, ассоциированный со старением (senescence-associated secretory phenotype, SASP). Сенесцентные клетки накапливаются по мере старения организма, что приводит к снижению их пролиферации и нарушению регенерации и функции тканей. SASP характеризуется повышенной секрецией биологически активных молекул стареющими клетками, включая хемокины, цитокины, протеазы и факторы роста [Basisty N., Kale A., Jeon O.H., et al., 2020]. По этим причинам SASP вовлечен в патогенез и прогрессирование заболеваний,

связанных со старением, включая ОА [Jeon O.H., David N., Campisi J., et al., 2018]. Ферменты, связанные с прогрессированием ОА, были идентифицированы как факторы SASP, и их избирательное ингибирование с помощью сеноморфиков (ингибиторы SASP и сеностатики), может в перспективе применяться при ОА. Однако доказательства специфического и протекторного действия сеноморфиков при лечении ОА в настоящее время не найдены [Coryell P.R., Brian O.D., Loeser R.F. et al., 2021].

Помимо хондроцитов в формировании SASP участвуют синовиальные фибробласты, макрофаги, остеобласты и адипоциты [Jeon O.H., David N., Campisi J., et al., 2018]. Воспалительная реакция, вызванная факторами SASP, приводит к дегенерации хряща и прогрессированию ОА. В отличие от ревматоидного артрита, ОА сначала рассматривали как заболевание, связанное с механическим износом суставного хряща. Однако в последнее десятилетие ОА рассматривается как сочетание травмы и воспаления, поскольку все больше доказательств указывают на значительную роль цитокинов и иммунных клеток в его патогенезе [Scanzello C.R., 2017]. Установлено, что митогенная стимуляция сенесцентных клеток может способствовать индукции их пролиферации и предотвращать ускоренное старение [Ogrodnik M., Salmonowicz H., Jurk D., et al., 2019]. Количество сенесцентных хондроцитов и синовиальных фибробластов имеет прямую корреляцию с возрастом [Del Rey M.J., Valin A., Usategui A., et al., 2019]. При посттравматическом ОА повреждение сустава может индуцировать старение хондроцитов и стимулировать деградацию хряща [Jeon O.H., Kim C., Laberge R.-M., et al., 2017]. Неадекватная механическая нагрузка также может быть одной из причин преждевременного старения тканей хряща после травмы.

SASP хондроцитов, остеоцитов и синовиальных фибробластов характеризуется укорочением теломер, гиперэкспрессией факторов апоптоза p53, p21, p16, усилением генерации активных форм кислорода (АФК) и повышением доли гетерохроматина [Del Rey M.J., Valin A., Usategui A., et al., 2019; Xu M., Bradley E.W., Weivoda M.M., et al., 2017]. Отличительной чертой

SASP клеток суставов при ОА является секреция провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-17, IL-1 $\beta$ ), онкостатина М и фактора некроза опухоли (TNF) [Basisty N., Kale A., Jeon O.H., et al., 2020]. Установлено, что концентрация IL-6 в синовиальной жидкости пациентов с ОА повышается [Pearson M.J., Herndler-Brandstetter D., Tariq M.A., et al., 2017]. Сигнальный путь IL-6–STAT3 индуцирует преждевременное старение клеток, что приводит к дальнейшему формированию SASP [Kojima H., Inoue T., Kunimoto H., et al., 2013]. Цитокины усиливают экспрессию матриксных металлопротеиназ (MMPs). MMP13 (коллагеназа-3) и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина ADAMTS-5, секретируются клетками во внеклеточном матриксе. Катаболическая активность MMPs и ADAMTS может разрушать белки внеклеточного матрикса в хряще, включая сульфатированные протеогликаны, коллаген и фибронектин. Деструкция внеклеточного матрикса (ВКМ) хряща является ключевым признаком ОА. Следовательно, для понимания патогенеза ОА и поиска новых подходов к терапии этого заболевания важно учитывать профиль молекул, формирующих SASP клеток сустава.

Поиск новых методов терапии ОА является актуальной задачей геронтологии и гериатрии в связи с высокой распространенностью этого заболевания. Особо следует подчеркнуть медико-социальное значение ОА, так как при наличии этой патологии существенно снижаются функциональные возможности суставов. Это является причиной иммобилизации больных и увеличения тяжести течения коморбидных заболеваний: сердечно-сосудистых, сахарного диабета, хронической обструктивной болезни легких, старческой астении по данным Минтруда России и Росстата. ОА в последние 15 лет является ведущей причиной инвалидности среди взрослого населения.

Хондропротекция предлагает профилактические стратегии, которые могут замедлить прогрессирование патологии суставов и утрату их функции, а также снизить выраженность болевого синдрома путем воздействия на сигнальные пути воспаления [Егоров И.В., 2022]. Однако для успеха таких стратегий



требуется подход, обеспечивающий целенаправленное воздействие на патофизиологию ОА на уровне всех тканей сустава. В настоящее время проводятся исследования, направленные на решение этой задачи.

Так, результаты клинического исследования I фазы показали, что низкомолекулярное вещество UBX0101 уменьшает боль в суставах и улучшает их функцию у пациентов с ОА при удовлетворительной безопасности и переносимости. Однако исследование II фазы не подтвердило эффективность UBX0101 при ОА [Zhang X.X., He S.H., Liang X., et al., 2021].

Большое внимание уделяется изучению возможности расширения целевого назначения пациентам с ОА уже известных лекарственных средств (например, препаратов, которые сегодня применяются при остеопорозе). Эти препараты могут потенциально использоваться и при определенных подтипах ОА, поскольку остеопороз и ОА имеют общие черты в плане вовлечения в патологический процесс костной ткани. Хотя такое репозиционирование препаратов для лечения остеопороза показало обнадеживающие результаты при доклиническом тестировании на моделях ОА, клинические исследования не подтвердили это предположение.

Другой фармакотерапевтический подход к лечению ОА основан на применении сенолитиков. Сенолитические препараты направлены на предотвращение заболевания, связанного со старением, путем таргетной активации апоптоза в стареющих клетках. Также применяют сеноморфные препараты, которые подавляют формирование SASP путем снижения активности белков, связанных с воспалением, таких как mTOR, или прямого ингибирования активности факторов SASP, таких как IL-6 и TNF. Этот подход успешно применяется в экспериментальных моделях *in vivo*, таких как идиопатический легочный фиброз, атеросклероз и рак, но на данный момент нет данных о его эффективности при ОА [Childs B.G., Gluscevic M., Baker D.J., et al., 2017].

Для снижения выраженности болевого синдрома при ОА применяют нестероидные противовоспалительные средства (НПВС): ингибиторы

супероксиддисмутазы SOD-2, опиоиды, кортикостероиды и др. На сегодняшний день ни один из этих препаратов не смог остановить прогрессирование ОА. Кроме того, многие препараты для облегчения течения ОА имеют ряд побочных действий [Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. Выпуск 17, 2009], а также ограничений и противопоказаний, которые часто встречаются у лиц пожилого возраста с ОА.

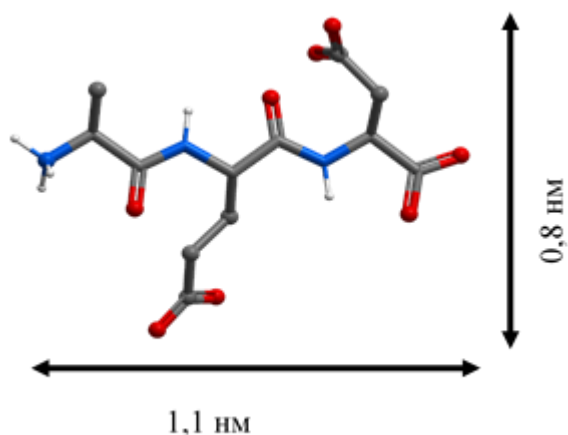
Для стимуляции регенерации хрящевой ткани используют корректоры метаболизма костной и хрящевой ткани, препараты, содержащие хондроитин сульфат (высокомолекулярный мукополисахарид, содержащийся в различных типах соединительной ткани) и глюкозамин [Henrotin Y., Mobasher A., Marty M., 2012]. Однако оценка результатов рандомизированных клинических исследований не дает возможности сделать вывод об эффективности применения этих препаратов.

В связи с этим на сегодняшний день остается актуальным дальнейшее изучение патогенеза ОА, а также поиск новых эффективных и безопасных препаратов для профилактики и лечения этого заболевания. Для решения этой задачи в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии были созданы полипептидный комплекс хрящей (Хондролюкс) и трипептид AED (Карталакс).

Хондролюкс – полипептидный комплекс, получаемый путем экстракции из хрящевой и костной тканей молодых животных. В состав Хондролюкса входят пептиды с молекулярной массой от 75 до 10000 Да. Хондролюкс рекомендован для профилактики и поддерживающей терапии при заболеваниях опорно-двигательного аппарата: артрозах и артритах, ревматизме, остеохондрозе, остеопорозе, подагре и др.

В Институте токсикологии ФМБА России был проведен анализ состава полипептидного комплекса хрящей. В нем методами матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации и ультраэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии был найден трипептид AED, обладающий биологической активностью, сходной с Хондролюксом

[Журкович И.К., Ковров Н.Г., Рыжак Г.А., и др., 2020]. Структура пептида представлена на рисунке 1. Карталакс рекомендован для профилактики и комплексной терапии следующих заболеваний: артрозы и артриты, остеохондроз, остеопороз, дегенеративно-дистрофические заболевания суставов, ревматизм, последствия травм суставов, подагра, системная профилактика костно-суставных травм в спорте, системные заболевания соединительной ткани, предоперационный и послеоперационный периоды при операциях на суставах, профилактика дегенеративных процессов в позвоночнике и суставах у людей пожилого и старческого возраста. Поскольку трипептид является небольшой молекулой, он не распознается клетками иммунной системы и не вызывает аллергической реакции и других побочных эффектов. Это обстоятельство особенно важно при лечении пациентов старших возрастных групп.



**Рисунок 1.** Двухмерная структура трипептида Карталакса.

В двух экспериментальных моделях травматического перелома у старых кроликов выявлен репаративный эффект ППКХ в отношении костной ткани. В исследуемой группе на место костного дефекта делали ежедневные аппликации ППКХ в дозе 0,7 мг/кг, растворенного в 2 мл физиологического раствора в течение 5 дней. У животных контрольной группы заживление проходило естественным путем. На 28-й день после применения ППКХ наблюдалось образование полноценной плоской губчатой кости. В контроле в

это время костный дефект сохранялся. Во втором эксперименте кроликам под наркозом в бедро вводили тефлоновую фистулу, которая фиксировалась к бедренной кости. Такой дизайн эксперимента позволяет оценить миграцию костномозговых элементов в образовавшееся пустотное пространство. Животным экспериментальной группы с 1-го по 7-й день эксперимента в просвет фистулы вводили полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в дозе 0,7 мг в 1 мл физиологического раствора. Под действием ППКХ формирование костной ткани наблюдалось на 3-й неделе эксперимента. В контроле (введение физиологического раствора) такой эффект достигался позже, только к концу 4 недели исследования [Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х., 2019].

В другом эксперименте моделировали развитие посттравматического ОА у крыс. Для этого животным наносили травму в области внутреннего мыщелка бедренной кости. На 5-е сутки у крыс развивались дегенеративно-дистрофические изменения хрящевой ткани суставной поверхности, характерные для ОА. Животные экспериментальных групп получали внутримышечно ППКХ в дозах 0,02 мг или 0,2 мг в 0,4 мл физиологического раствора 1 раз в день на протяжении 10 дней. Крысам контрольной группы по той же схеме вводили 0,4 мл физиологического раствора. На 28-е сутки эксперимента под действием ППКХ происходило восстановление структуры хрящевой ткани [Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х., 2019].

В другом экспериментальном исследовании было показано восстановление минеральной плотности костной ткани у крыс после овариоэктомии (модель остеопороза) под действием ППКХ и трипептида AED. Исследование было проведено на 100 крысах линии Wistar (половозрелые самки). Через 1 месяц после овариоэктомии у крыс по данным денситометрии наблюдалось снижение минеральной плотности костной ткани. Крыс разделили на несколько групп: 1 - контроль (без операции, инъекции физиологического раствора), 2 – овариоэктомия, 3 – трипептид AED (10 мкг), начиная с 4-го дня после овариоэктомии, 4 – трипептид AED (10 мкг),

начиная с 30-го дня после овариоэктомии, 5 - ППКХ (1 мг), начиная с 4-го дня после овариоэктомии, 6 - ППКХ (1 мг), начиная с 30-го дня после овариоэктомии. При применении ППКХ с 30-го дня после овариоэктомии была продемонстрирована сниженная минеральная плотность костной ткани, и через месяц после окончания введения препарата достигнутый эффект сохранялся, тогда как для АЕД сохранения эффекта не наблюдалось, хотя в процессе применения препарата минеральная плотность костной ткани повышалась [Хавинсон В.Х., Поворознюк В.В., Гапкалова И.В., и др., 2007]. Результаты этого экспериментального исследования легли в основу рекомендации длительного применения трипептида АЕД и ППКХ с целью профилактики остеопороза, особенно у женщин старше 50 лет.

Также было показано положительное влияние АЕД на метаболизм кальция в костной ткани. Нарушение обмена кальция в костной ткани приводит к развитию остеопороза. В эксперименте было изучено влияние АЕД на морфофункциональную организацию кальцитонин-продуцирующих клеток щитовидной железы эпифизэктомированных крыс. Удаление эпифиза, центрального органа нейроиммуноэндокринной системы, что приводит к нарушению функций щитовидной железы и развитию остеопороза. Через 21 сутки после эпифизэктомии крысам линии Wistar инъекционно вводили АЕД в дозе 0,5 мкг на крысу в течение 10 дней (подопытная группа), контрольным животным по той же схеме вводили физиологический раствор. На 3-12 сутки после окончания инъекций АЕД наблюдалось восстановление структуры ткани щитовидной железы у крыс после эпифизэктомии. АЕД способствовал увеличению количества С-клеток щитовидной железы и восстановлению их функции, что указывает на усиление процесса резорбции кальция в костной ткани. Эти данные могут иметь важное значение при лечении остеопороза.

Для выявления молекулярного механизма действия ППКХ и трипептида АЕД были проведены исследования в культурах ткани хряща молодых и старых крыс. Рост хондроцитов оценивали по индексу площади. Это отношение суммы площади центральной зоны эксплантата (фрагмента хряща)

и периферической зоны (клетки, образовавшиеся рядом с исходным фрагментом хряща путем деления) к площади центральной зоны в процентах. Установлено, что оба пептидных препарата повышали индекс площади хряща на 18-38%. Кроме того, ППКХ и трипептид AED стимулировали синтез молекулярного маркера пролиферации (роста) клеток хряща – PCNA и снижали синтез молекулы p53 – пускового фактора запрограммированной гибели клеток (апоптоза). Активация гена p53 индуцирует апоптоз и старение хондроцитов. Оксидативный стресс, вызванный воспалительной реакцией при остеоартрозе, повышает экспрессию p53. Подавление экспрессии p53 предотвращает апоптоз хондроцитов. PCNA (ядерный антиген пролиферирующей клетки) - белок, который действует как кофактор ДНК-полимеразы  $\delta$  и участвует в репарации ДНК и делении клетки. При остеоартрозе пролиферативный потенциал хондроцитов (способность клеток хряща делиться) снижается, что приводит к нарушению структуры и функции хряща. ППКХ и трипептид AED восстанавливают в хондроцитах синтез PCNA и способствуют репарации хряща при остеоартрозе [Чалисова Н.И., Рыжак Г.А., Войцеховская М.А., и др., 2011].

Таким образом, полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей и входящий в его состав трипептид AED показали эффективность в терапии заболеваний опорно-двигательного аппарата (ОА, остеопороз, остеохондроз и др.) в эксперименте. Трипептид AED нормализует плотность костной ткани при остеопорозе за счет регуляции функции кальцитонинпродуцирующих клеток щитовидной железы. Механизмом действия полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей и трипептида AED является их способность снижать синтез белка p53 (маркер запрограммированной клеточной гибели) и повышать синтез белка пролиферации PCNA (маркер деления клеток) в хондроцитах.

## **1.1.1. Молекулы, формирующие SASP хондроцитов, и участвующие в патогенезе остеоартрита**

### **1.1.1.1. Факторы транскрипции, апоптоза и маркеры клеточного старения**

Для хондроцитов описано репликативное (естественное) и преждевременное старение, вызванное стрессом (SIPS) [Ashraf S., Cha B.-H., Kim J.-S., et al., 2016]. Репликативное старение обусловлено укорочением теломер. SIPS возникает при воздействии окислительного стресса и повреждении ДНК без изменения длины теломер. Активация генов p53, p21, pRb индуцирует апоптоз и репликативное старение хондроцитов. Однако p16 и pRb также играют важную роль в развитии SIPS.

Оксид азота увеличивает экспрессию p53 в хондроцитах путем фосфорилирования p38-MAPK и p53, активируя экспрессию гена BAX. Повышенная экспрессия p53 также характерна для хондроцитов при ОА. Подавление экспрессии p53 предотвращает апоптоз этих клеток [Hashimoto S., Nishiyama T., Hayashi S., et al., 2009].

Повышение экспрессии другого проапоптотического гена, p16, может рассматриваться как катализатор формирования SASP хондроцитов. Такой вывод делается на основании положительной корреляции гиперэкспрессии p16 и повышения синтеза воспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-6), MMP1 и MMP13 в сенесцентных хондроцитах [Philipot D., Guerit D., Platano D., et al., 2014]. АФК являются активаторами p16, которые способствуют старению и дедифференцировке клеток хряща. В основном p16 участвует в остановке клеточного цикла на стадии G1, блокируя CDK4/6 и активируя pRb, p107, p130. Ингибирование siRNA p16 нормализует функции хондроцитов при ОА.

p16 индуцирует клеточное старение путем связывания CDK4 и CDK6 и предотвращения последующего ингибирования белка-репрессора клеточного цикла pRb [Coryell P.R., Brian O.D., Loeser R.F., 2021]. p16 активируется в ответ на окислительный стресс, вызванный АФК. Гиперэкспрессия p16 коррелирует с возрастом в хондроцитах суставов мыши и человека [Diekman B.O., Sessions

G.A., Collins J.A., et al., 2018]. Хондроциты с повышенной экспрессией p16 характеризуются снижением синтеза белков внеклеточного матрикса и увеличением синтеза MMP1 и MMP13, формирующих SASP. Эти данные свидетельствуют о том, что старение хондроцитов приводит к их метаболической трансформации, которая способствует разрушению хряща. При этом инактивация p16 в хондроцитах мышей не ингибировала формирование SASP и не предотвращала развитие ОА.

p38 является ключевым белком сигнального пути MAPK. В хондроцитах этот сигнальный каскад вовлечен в регуляцию метаболизма и ремоделирование межклеточного матрикса. Ингибирование пути p38-MAPK способствует повышению синтеза коллагена II типа, агрекана и нормализации экспрессии BCL2 в хондроцитах [Rosenzweig D.H., Ou S.J., Quinn T.M., 2013]. Установлено, что стресс индуцирует фосфорилирование p38, апоптоз и приводит к ускоренному старению хондроцитов [Takebe K., Nishiyama T., Hayashi S., et al., 2011]. Пролиферация и дифференцировка хондроцитов были снижены у трансгенных мышей со сверхэкспрессией белка MKK6, активатора сигнального пути p38-MAPK. Концентрация p38 в хондроцитах при ОА выше, чем в норме. Активация p-p38, p-JNK и p-ERK при ОА указывает на участие сигнального пути MAPK в этом процессе [Peng H.Z., Yun Z., Wang W., et al., 2017]. MAPK является медиатором, который регулирует последующую экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1, TNF- $\alpha$  и MMPs. Этот путь может стать мишенью для лекарственных препаратов, замедляющих прогрессирование ОА [Xie L., Xie H., Chen C., Tao Z., et al., 2019].

Установлено, что остановка роста хондроцитов при репликативном старении также обусловлена снижением уровня PCNA и повышением синтеза p21. Экспрессия PCNA и коллагена II типа отрицательно коррелирует с синтезом p21 [Kim H.J., Park S.R., Park H.J., et al., 2005].



### 1.1.1.2. Сиртуины

Сиртуины SIRT1, SIRT3 и SIRT6 являются геропротекторными белками и вовлечены в регуляцию сигнальных путей mTOR, PI3K, AMPK, NF-κB в клетках хряща [Chen C., Zhou M., Ge Y., et al., 2020]. У мышей с нокаутом гена *Sirt1* выявлено быстрое прогрессирование ОА и ускоренное старение организма [Dudek M., Gossan N., Yang N., et al., 2016]. SIRT1 взаимодействует со специфичным для хондроцитов фактором транскрипции SOX9 и способствует активации синтеза коллагена II типа. SIRT1 регулирует экспрессию генов, кодирующих компоненты ВКМ хряща. SIRT1 расщепляется с образованием неактивного N-концевого (NT) полипептида и C-концевого (CT) фрагмента в хондроцитах при стрессе, обусловленном воспалением. При этом отношение NT/CT в плазме крови является маркером ранней стадии ОА [Batshon G., Elayyan J., Qiq O., Reich E., et al., 2020]. Ингибирование SIRT1 приводит к снижению активности циркадного гена *Bmal1* [Yang W., Kang X., Liu J., et al., 2016] и коррелирует с повреждением хряща [Dudek M., Gossan N., Yang N., et al., 2016].

SIRT3 участвует в поддержании гомеостаза митохондрий в хондроцитах и предотвращает развитие ОА путем деацетилирования фермента SOD2. Следует отметить, что активность SOD2 снижается в хондроцитах при старении и развитии ОА вследствие повышенного посттрансляционного ацетилирования лизина [He Y., Wu Z., Xu L., et al., 2020].

Снижение синтеза SIRT6 индуцирует повреждение ДНК и дисфункцию теломер при репликативном, ускоренном старении хондроцитов и при ОА. При этом сверхэкспрессия SIRT6 в хондроцитах коленного сустава мыши замедляет прогрессирование ОА [Wu Y., Chen L., Wang Y., et al., 2015]. IL-1β ингибирует синтез SIRT6 и стимулирует экспрессию MMP13 [Blaney Davidson E.N., van Saam A.P., van der Kraan P.M., 2017]. Эти исследования показывают, что активаторы SIRT6 могут быть потенциальными терапевтическими

мишенями для предотвращения ускоренного старения хондроцитов и замедления развития ОА [Liu Y., Zhang Z., Li T., et al., 2022].

### **1.1.1.3. Ферменты антиоксидантной системы**

Механический, оксидативный стресс и старение являются основными факторами риска развития ОА [Chow Y.Y., Chin K.-Y., 2020]. Повреждение мтДНК свободными радикалами является одной из возможных причин, приводящих к старению ускоренному старению хондроцитов при ОА, что может быть связано с укорочением теломер [Almeida M., O'Brien C.A., 2013]. Снижение уровня антиоксидантных ферментов связано с ускоренным старением хондроцитов. У мышей с нокаутом гена, кодирующего фермент SOD2, было отмечено развитие ОА и снижение продолжительности жизни, что коррелировало с повышением экспрессии генов p16 и p21 в хондроцитах [Zhang Y., Unnikrishnan A., Deera S.S., et al., 2017]. Дисфункция SOD2 приводит к тяжелому течению ОА, в то время как сверхэкспрессия этого фермента или использование антиоксидантов снижают риск развития этого заболевания. Окислительный стресс также активирует путь NF-κB и способствует повышенной синтезу IL-1, IL-6 и MMP [Minguzzi M., Cetrullo S., D'Adamo S., et al., 2018].

### **1.1.1.4. Цитокины**

Цитокины являются основными участниками любых воспалительных состояний, включая ОА. Провоспалительные цитокины, такие как IL-1β и TNF-α секретируются на ранних стадиях ОА [Ma C.H., Wu C.H., Jou I.M., et al., 2018; Min S., Wang C., Lu W., et al., 2017; Ni S., Miao K., Zhou X., et al., 2015]. Они продуцируются активированными хондроцитами, синовиоцитами и мононуклеарными клетками. TNF-α и IL-1β активируют воспалительный иммунный ответ в культуре хондроцитов и синовиоцитов. При стимуляции клетки продуцируют IL-6, IL-8 [Yu C.D., Miao W.H., Zhang Y.Y., et al., 2018], IL-10 [Jiang Y., Zhu L., Zhang T., et al., 2017], IL-1 β [Sun T., Li X., Song H., Gao F., et al., 2017] и TNF-α [Jiang Y., Zhu L., Zhang T., et al., 2017]. Аналогичный профиль цитокинов был выявлен в моделях ОА у животных [Ding Y., Wang L.,

Zhao Q., et al., 2019; Li H., Xie S., Qi Y., et al., 2018; Schmidli M.R., Fuhrer B., Kurt N., et al., 2018].

IL-1 $\beta$  препятствует выработке основных структурных белков хондроцитов, включая коллаген II типа и агрекан, и стимулирует синтез MMP-1 и MMP-13, которые разрушают хрящ [Zhang G., Sun Y., Wang Y., et al., 2016]. Было также показано, что IL-1 $\beta$  индуцирует выработку активных форм кислорода и NO. IL-1 $\beta$  стимулирует экспрессию TNF- $\alpha$  и его рецептора в хондроцитах. Связывание TNF- $\alpha$  с TNFR вызывает передачу сигнала и активирует фактор 2, ассоциированный с рецептором TNF (TRAF2). TRAF2 активирует NF- $\kappa$ B, участвующий в развитии ОА.

Установлено, что у пациентов с ОА в тканях синовиальной оболочки сустава повышен синтез IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, IL-17, IL-22 и TGF  $\beta$ 1 [18]. IL-17 индуцирует высвобождение IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$  синовиальными фибробластами и хондроцитами, что приводит к воспалению и разрушению хряща. IL-17 секретируется Т-хелперами Th17, тучными и миелоидными клетками. Помимо этого, IL-17 способствует рекрутированию и активации нейтрофилов [Rosales C., 2018]. Активированные нейтрофилы синтезируют несколько провоспалительных факторов, способствующих прогрессированию ОА. Было показано, что IL-17 присутствует в синовиальной жидкости подгруппы пациентов с терминальной стадией ОА. Повышенные уровни IL-17 и IL-22 также обнаруживаются в синовиальной жидкости височно-нижнечелюстного сустава у пациентов с ОА [Monasterio G., Castillo F., Rojas L., et al., 2018]. Увеличение синтеза этих двух цитокинов связано с повышением активности рецептора NF- $\kappa$ B и его лиганда RANKL, который индуцирует дифференцировку остеокластов и резорбцию субхондральной кости. IL-22 стимулирует пролиферацию синовиальных клеток и усиливает экспрессию MMPs в синовиоцитах.

IL-6 известен как провоспалительный цитокин, синтез которого повышается при хронических воспалительных заболеваниях. При ОА IL-6, высвобождаемый тканью сустава, связывается с растворимым рецептором IL-

6R, что приводит к активации иммунной системы, в результате чего моноциты мигрируют в воспаленную область сустава [Wu Y., Li Z., Jia W., et al., 2019]. Favero и соавт. (2019) определили воспалительные молекулы, продуцируемые при совместном культивировании ткани мениска и синовиальной оболочки у пациентов с ранней и конечной стадией ОА. Выявлено повышение IL-6 и IL-8. При этом у пациентов с терминальной стадией заболевания этот процесс прогрессирует [Favero M., Belluzzi E., Trisolino G. et al., 2019]. При ОА IL-8 в синовиальной жидкости активирует нейтрофилы и способствует их миграции в очаг воспаления. Активированные нейтрофилы секретируют фермент эластазу, которая разрушает поперечные связи коллагена II типа и протеогликана в суставном хряще.

IL-37 - противовоспалительный цитокин из семейства IL-1. Уровень IL-37 повышается у пациентов с ОА [Ding L., Hong X., Sun B., et al., 2017]. IL-37 снижает синтез провоспалительных цитокинов и катаболических ферментов в хондроцитах и синовиоцитах при ОА. Было показано, что уровни IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 в крови были выше у пациентов с ОА по сравнению с контрольной группой. В исследовании Xia et al. (2017) также был обнаружен повышенный уровень IL-10 в LAG-3-регуляторных Т-клетках (Treg) у пациентов с ОА коленного сустава [Xia J., Ni Z., Wang J., et al., 2017]. В других работах продемонстрировано снижение синтеза IL-4 в суставном хряще у пациентов с ОА [He Q., Sun C., Lei W., et al., 2017]. При этом экспрессия рецептора к IL-4 в сыворотке крови пациентов с ОА повышается.

Помимо вышеупомянутых цитокинов, при ОА отмечено повышение синтеза IL-18, TGF  $\beta$ 1, рецептор к IL-1 (IL-1R) [Sun Y., Zhou L., Lv D., et al., 2015] и IL-1  $\alpha$  в хондроцитах. Кроме того, выявлено увеличение уровней IL-21, IL-17A и IFN- $\gamma$  в сыворотке крови у пациентов с ОА [Shan Y., Qi C., Liu Y., et al., 2017]. IL-21 также усиливает экспрессию RANKL, стимулируя стволовые клетки костного мозга дифференцироваться в остеокласты. Баланс между цитокинами и другими сигнальными молекулами при ОА изучали с использованием кондиционированной макрофагами среды (КС). Выявлен

повышенный синтез провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP13, ADAMTS5) и снижение продукции компонентов хрящевого матрикса (агрекан, коллаген II типа) в эксплантатах хряща при ОА, культивируемых с КС.

NF- $\kappa$ B играет центральную роль в патогенезе ОА [Gui T., He B., Gan Q., et al., 2017]. Он активируется провоспалительными цитокинами и продуктами распада внеклеточного матрикса. Активированный NF- $\kappa$ B модулирует экспрессию нескольких цитокинов, хемокинов и ферментов, разрушающих матрикс, что объясняет его роль в регуляции катаболических процессов при ОА. Сигнальный путь NF- $\kappa$ B начинается с активации I $\kappa$ B киназы, что приводит к фосфорилированию и деградации I $\kappa$ B $\alpha$  протеасомой. Затем происходит фосфорилирование белка p65, который перемещается из цитоплазмы в ядро. Это приводит к активации экспрессии генов MMP-13 и IL-6 [Chen Q., Wu S., Wu Y., et al., 2018]. Экспрессия KPNA2, который регулирует доставку p65 в ядро, также повышается при ОА.

#### **1.1.1.5. Матриксные металлопротеиназы**

MMPs представляют собой семейство цинк-зависимых ферментов, которые регулируют деградацию внеклеточного матрикса путем расщепления пептидной связи белков-мишеней. Синтез MMP-3, MMP-9, MMP-13 был повышен, а экспрессия TIMP-2 снижена в хрящевой ткани у животных с индуцированным ОА [Li H., Xie S., Qi Y., et al., 2018]. При моделировании ОА *in vitro* также было выявлено увеличение синтеза MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 хондроцитами. Кроме того, в нескольких исследованиях продукция MMP-13 в хондроцитах пациентов с ОА также была повышена [Zeng R.M., Lu X.H., Lin J., et al., 2019]. MMP-13, как коллагеназа, отвечает за деградацию коллагена II типа, который является основным типом коллагена в суставном. Экспрессия MMP-13 увеличивалась за счет стимуляции CCL20 и регуляторного фактора интерферона-8 (IRF-8) в хондроцитах, полученных от пациентов с ОА [Yang Q., Ding W., Cao Y., et al., 2018]. При этом сверхэкспрессия IL-37 в хондроцитах способствовала снижению уровня MMP-

13. Экспрессия Runx2, остеогенного активатора транскрипции, усиливается при ОА. Было показано, что Runx2 активирует экспрессию MMP-13 хондроцитами.

MMP-1 является еще одной желатиназой, синтез которой в хондроцитах повышается при ОА. MMP-3, также известный как стромелизин-1, расщепляет коллаген II типа и агрекан. Показано, что хемокин CX3CL1 индуцирует выработку MMP-3 зависимым от концентрации и времени способом в синовиальных фибробластах, полученных от пациентов с ОА [Hou S.M., Hou C.H., Liu J.F. et al., 2017]. Помимо этого, в нескольких исследованиях выявлен повышенный уровень MMP-3 в хондроцитах при ОА [Zeng R.M., Lu X.H., Lin J., et al., 2019]. Индукция MMP-3 была связана с экспрессией miR-149 и miR-454 при ОА.

MMP-2 и MMP-9 ответственны за расщепление внеклеточного матрикса, цитокинов и хемокинов, а их синтез повышается в хрящевой ткани при ОА [Yang Q., Ding W., Cao Y., et al., 2018]. Экспрессия MMP-10 хондроцитами также увеличивается на ранней и терминальной стадии ОА [Favero M., Belluzzi E., Trisolino G., Goldring M., et al., 2019]. Предполагается, что дисбаланс между количеством MMP и их ингибиторов TIMP связан с разрушением суставов при ОА. Синтез TIMP-2, TIMP-3 и TIMP-4 был повышен, а TIMP-1 - снижен в хондроцитах у пациентов с ОА.

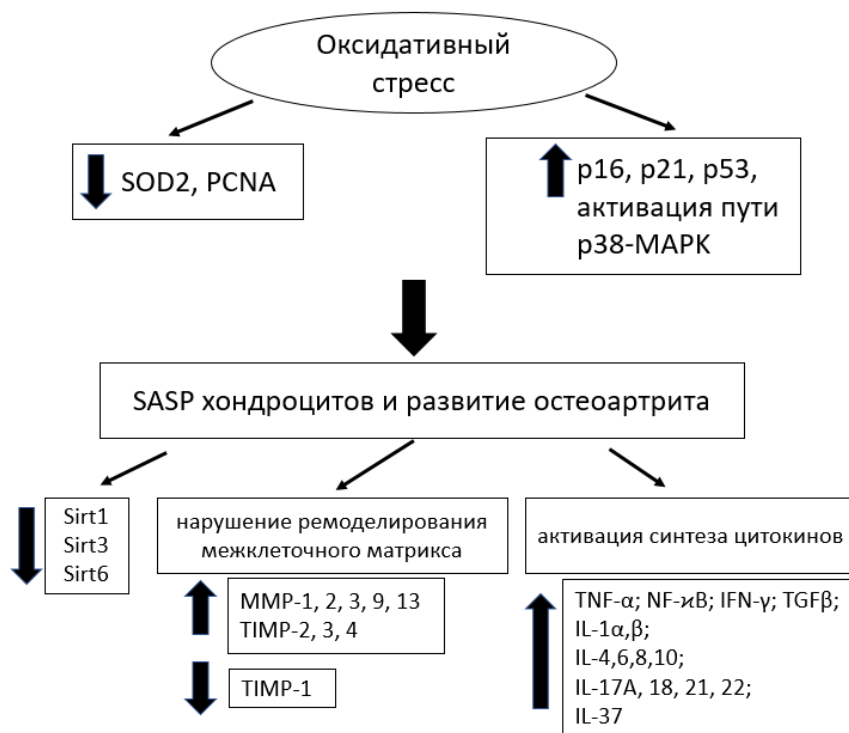
#### **1.1.1.6. Оксид азота**

Оксид азота (NO), индуцируемая синтаза оксида азота (iNOS) и простаглицлиновый путь (циклооксигеназа-2 (COX-2), простаглицлин E2 (PGE2)) также являются неотъемлемой частью патогенеза ОА. IL-1 $\beta$  активирует iNOS и COX-2 при ОА, что приводит к увеличению продукции NO и PGE2. Повышенный уровень NO ингибирует синтез коллагена II типа и протеогликана. Кроме того, активированный PGE2 ингибирует пролиферацию хондроцитов и снижает синтез компонентов внеклеточного матрикса. IL-1 $\beta$  также стимулирует выработку дезинтеграрина и MMP с мотивом тромбоспондина (ADAMTS-5), агреканазы, которая вызывает деградацию

агреганов. Было обнаружено повышение синтеза iNOS, NO, COX-2, PGE2, ADAMTS-5, ADAMTS-4, VEGF в хондроцитах при моделировании OA *in vivo*. Это приводило к усиленной продукции факторов воспаления и деградации компонентов внеклеточного матрикса в ткани хряща [Qu R., Chen X., Wang W., et al., 2018].

### Заключение к разделу 1.1

Таким образом, оксидативный стресс приводит к ускоренному старению хондроцитов [Coryell P.R., Brian O.D., Loeser R.F., 2021]. Он активирует сигнальный путь p38-MAPK, синтез проапоптотических белков p16, p21, p53 и приводит к снижению синтеза пролиферотропного белка PCNA и антиоксидантного фермента SOD2 хондроцитами. Все это приводит к формированию SASP хондроцитов и может приводить к развитию OA (рис. 2).



**Рисунок 2.** Оксидативный стресс и молекулярные маркеры старения хондроцитов, вовлеченные в патогенез остеоартрита.

Оксидативный стресс является одним из основных факторов формирования SASP хондроцитов. Индуцированный свободными радикалами SASP хондроцитов вызывает в них метаболические изменения, которые со

временем могут способствовать развитию ОА. Оксидативный стресс приводит к укорочению длины теломер, повышению экспрессии проапоптотического протеина p53, ингибиторов циклинзависимой киназы p21 и p16, активации пути p38-МАРК, снижению синтеза пролиферотропного белка PCNA и антиоксидантного фермента SOD2 хондроцитами. Эти события формируют SASP хондроцитов и повышают вероятность развития ОА. SASP хондроцитов характеризуется снижением синтеза сиртуинов (SIRT1, 3, 6), нарушением ремоделирования межклеточного матрикса (повышение синтеза MMP-1, -2, -3, -9, -13 и TIMP-2, -3, -4, снижение синтеза TIMP-1) и активацией продукции цитокинов (IL-1 $\alpha$ , $\beta$ , -4, -6-, -8, -10,-17A, -18,-21,-22, -37, TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ ).

Перспективными кандидатами для предотвращения формирования SASP хондроцитов и терапии ОА являются пептидные биорегуляторы Хондрюкс и Карталакс. Это молекулы с физиологическим механизмом действия, обладающие геропротекторными и хондропротекторными эффектами. ППКХ Хондрюкс содержит низкомолекулярные пептиды, обладающие тканеспецифическим действием на клетки хрящевой и костной тканей, выражающимся в повышении их пролиферативной активности и оптимизации обменных процессов. Применение ППКХ снижает выраженность дегенеративно-дистрофических изменений хрящевой поверхности суставов при ОА за счет нормализации метаболизма хондроцитов и межклеточного матрикса. Активным началом полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей является трипептид AED, обладающий аналогичной биологической активностью. Полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей и трипептид AED снижают синтез белка p53 и повышают экспрессию протеина PCNA, препятствуя формированию SASP хондроцитов. Можно предположить, что эти пептидные биорегуляторы будут регулировать синтез и других компонентов SASP, что требует проведения молекулярных исследований в моделях старения хондроцитов *in vitro*.



Таким образом, понимание молекулярных механизмов старения хондроцитов и формирования SASP имеет важное фундаментальное и практическое значение для разработки геропротекторных средств, эффективных при ОА.

## **1.2. Пептидная регуляция хондрогенной дифференцировки стволовых клеток**

К существующим методам лечения ОА относят обезболивание при помощи НПВС и лечебную физкультуру (ЛФК). При острой боли и осложнениях применяют внутрисуставное введение кортикостероидов; на малых выборках тестируются эффекты введения гидроксихлорохина [Hermann W., Lambova S., Muller-Ladner U., 2018]. Ввиду широкой распространенности ОА среди лиц среднего и пожилого возраста, необходима разработка новых терапевтических методов этого заболевания, нацеленных на поддержание структуры и нормализацию функциональной активности хрящевой ткани.

Многообещающим направлением терапии ОА является класс методов регенерации хрящевой ткани. Для лечения очаговых поражений суставного хряща коленного сустава в эксперименте изучали следующие методы: имплантацию аутологичных хондроцитов (ACI) и ее модификацию MACI, мозаичную хондропластику, хондрогенную дифференцировку МСК, введение богатой тромбоцитами плазмы, факторов роста и костных морфогенетических белков, применение эластично-подобных полипептидных гелей; титановые импланты, покрытые стволовыми клетками, хондропротекцию импульсными электромагнитными полями [Rodriguez-Merchan E.C., 2013]. Указанные методы имеют различную эффективность и требуют дальнейшего изучения.

МСК представляют собой перспективный ресурс для клеточных биотехнологий. В данный момент разработаны протоколы для их получения из периферической крови, костного мозга, жировой ткани и др. [Rakic R.,

Bourdon B., Demoor M., et al., 2018; Mushahary D., Spittler A., Kasper C., et al., 2018]. Классически МСК дифференцируются в остеобласты, хондробласты, адипоциты и фибробласты, но наблюдается их способность дифференцироваться и в другие типы клеток. Добавление специальных факторов в среду при культивировании МСК направляет их развитие по хондрогенному пути дифференцировки. В 2003 году были выполнены первые операции на суставах с использованием МСК костного мозга (КМ-МСК). Предтрансплантационное культивирование МСК с целью накопления клеточной биомассы является одним из необходимых и ключевых этапов восстановительной клеточной терапии. Однако в условиях *in vitro* пока не удается нарастить большие количества МСК с полностью сохраненным потенциалом дифференцировки. Поэтому изучение молекулярных каскадов хондрогенной дифференцировки стволовых клеток остается актуальным для разработки новых и модификации существующих методов репарации хрящевой ткани.

В связи с этим далее был проведен анализ молекулярных аспектов хондрогенной дифференцировки стволовых клеток в качестве мишеней для репарации хрящевой ткани при ОА, а также веществ, способных регулировать этот процесс.

### **1.2.1. Дифференцировка хондроцитов человека**

Источником хрящевой ткани в эмбриональном развитии является скелетогенная склеротомная мезенхима, дающая начало популяции плюрипотентных клеток скелетогенной мезенхимы (ПКСМ). ПКСМ дают начало бипотентным остеохондрогениторным клеткам, которые обладают остеогенным и хондрогенным потенциалом. Один из путей дифференцировки ПКСМ – остеобласты и дальнейшее формирование плоских костей, например, костей черепа. Другой способ образования костей – эндохондральный, то есть через промежуточный хрящ. Остеохондрогениторные клетки в этом случае формируют предхрящевую массу, внутренние клетки которой дифференцируются в ранние хондроциты, в то время как клетки на периферии

массы остаются незадействованными. Ранние хондроциты претерпевают этапы дифференцировки, уплощаются, складываются в продольные столбики – формируют ростовые пластинки. Ранние хондроциты активно пролиферируют до тех пор, пока не достигнут пре-гипертрофической стадии. На ней происходит индукция остеогенеза клеток, расположенных на периферии предхрящевой массы – перихондрия. За пре-гипертрофической стадией следует гипертрофия и апоптоз хондроцитов. Из перихондрия в область локализации хондроцитов мигрируют остеобласты, эндотелиальные клетки, остеокласты и гемопоэтические клетки, формируя на месте хряща костную и костно-мозговую ткани.

Помимо остеохондропрогениторных клеток, скелетогенные предшественники мезенхимы могут дифференцироваться в суставные хондроциты (хондроциты суставного хряща), через стадию мультипотентных суставных предшественников, дающих начало синовиоцитам [Mushahary D., Spittler A., Kasper C., et al., 2018].

Каждая стадия дифференцировки остеобластов и хондроцитов характеризуется экспрессией определенных генов: ранние хондроциты экспрессируют *Col2a1* (коллаген II типа) и *Acan* (аггрекан); столбчатые клетки - *Fgfr3*; пре-гипертрофированные клетки - *Ppr* (parathyroid hormone-related protein receptor), *Ihh* (Indian hedgehog), и *Col10a1* (коллаген X типа), а гипертрофированные клетки экспрессируют *Col10a1*. Терминальные хондроциты минерализуют внеклеточный матрикс; их маркерами являются *MMP13* и *Bsp* (bone sialoprotein) [Yi S.W., Kim H.J., Oh H.J., et al., 2018].

Установлено, что *in vitro* МСК могут формировать хрящеподобную ткань, содержащую типичные для хряща биомолекулы: коллаген II типа, протеогликаны, аггрекан [Griffin M., Hindocha S., Khan W.S., 2012]. Наиболее изученными являются КМ-МСК. Перспективным представляется изучение МСК послеродовой плаценты (П-МСК), ввиду доступности биоматериала и их высокого пролиферативного потенциала. Жерносеченко и соавт. (2021) провели сравнительный анализ хондрогенного и остеогенного потенциала

КМ-МСК и П-МСК. Для их хондрогенной дифференцировки авторы культивировали клетки в пеллетах (3D-системах) в среде DMEM с содержанием TGF $\beta$  и IGF1. После направленной индукции проводили анализ основных хондрогенных маркеров *Runx2*, *Sp7*, *DMP*, *Coll2*, *Coll1*, *Coll10*, *COMP*, *Ver* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Показано, что среди генов, отвечающих за синтез коллагенов, экспрессия *Coll2* в 18 раз, а *Coll10* – в 4 раза выше в преддифференцированных КМ-МСК, чем в П-МСК. Таким образом в КМ-МСК наблюдается более интенсивный синтез коллагена II и X типов. Экспрессия гена COMP, отвечающего за синтез олигомерного матричного белка хряща, который связывает между собой коллагеновые волокна, более чем в 6 раз выше в преддифференцированных П-МСК, чем в КМ-МСК. Экспрессия гена версикана из семейства агреканов - в 2 раза выше в преддифференцированных П-МСК по сравнению с КМ-МСК. В культурах П-МСК также наблюдалось большее содержание мукополисахаридов, чем в культурах КМ-МСК [Zhernasechanka N.A., Isaikina Y.I., Filipovich T.V., et al., 2021].

Схожие результаты касательно содержания различных типов коллагенов после дифференцировки МСК получены Bernardo и соавт. (2007) методом иммуногистохимии. После хондрогенной дифференцировки в КМ-МСК повышался синтез коллагенов типов II, IX и X [Bernardo M.E., Emons J. A. M., Karperien M., et al., 2007].

Однако хрящ, полученный при помощи тканевой инженерии, не достигает строения и функциональности нативного хряща. Содержание коллагена в искусственном хряще на 50% ниже, чем в нативном. Ультраструктура и пространственная организация волокон искусственного хряща также отличается от нативного, что сказывается на его механических свойствах [Zha K., Sun Z., Yang Y., et al., 2021]. Недостатком искусственного хряща является приобретение дифференцированными хондроцитами гипертрофированного фенотипа, характеризующимся значительным повышением метаболической активности, депонированием больших количеств клеток ВКМ, в том числе

коллагена X типа, и производством щелочной фосфатазы - фермента, участвующего в матричной минерализации, и их последующий апоптоз, что приводит к снижению его функциональной активности [Somoza R.A., Welter J.F., Correa D., et al., 2014]. Текущие исследования направлены на улучшение понимания процессов хондрогенной дифференцировки и оптимизацию имеющихся стратегий культивирования МСК для тканевой инженерии хряща.

### **1.2.2. Факторы хондрогенеза мезенхимальных стволовых клеток**

Для хондрогенной дифференцировки *in vitro* требуется два условия: наличие ростовых факторов (bFGF, TGF- $\beta$ 3, BMP-2) в культуральной среде, а также 3D-система культивирования. Мониторинг хондрогенеза в культуре проводят по экспрессии генов агрекана, фактора транскрипции *Sox9* и коллагена II типа (*Col2a1*) методами количественной ПЦР или иммуногистохимии. Хондрогенная дифференцировка сопровождается появлением молекул HLA-DR на мембране предшественников хондроцитов [Shachpazyan N.R., Astrelina T.A., Yakovleva M.V., 2012].

TGF- $\beta$ 1, 2, 3 являются единственными установленными факторами хондрогенеза, добавление которых в культуральную среду приводит к накоплению протеогликана и коллагена II типа [Boeuf S., Richter W., 2010]. Предполагается, что дисрегуляция сигналинга TGF $\beta$  в МСК может быть одной из причин развития ОА. Показано, что TGF- $\beta$ 1 обеспечивает пролиферацию хондроцитов и индуцирует экспрессию маркеров гипертрофированных хондроцитов – коллагена X типа, Runx2 и Alpl посредством сигнального пути Notch- Shh- Foxa [Ma L., Yang Z., Ding J., et al., 2019]. TGF- $\beta$  активирует хондрогенную дифференцировку в культуре частично через опосредованное снижение активности синтеза N-кадгерина, что приводит к снижению активации сигнального пути RhoA/ROCK [Futrega K., Robey P.G., Klein T.J., et al., 2021].

Транскрипционные факторы (ТФ) контролируют дифференцировку хондроцитов на уровне экспрессии генов. Некоторые хондрогенные транскрипционные факторы, такие как SOX9 и RUNX2/3, играют ведущую

роль в определенных этапах дифференцировки, в то время как другие – например SOX5/6 и MEF2C/D, могут поддерживать или снижать активность ведущих транскрипционных факторов. К регуляторам хондрогенной дифференцировки относятся факторы роста, регулирующие пролиферацию и темп дифференцировки.

К ТФ с  $\beta$ -скаффолдами относятся белки SOX, связывающие ДНК по мотиву C[A/T]TTG[A/T][A/T]. Ген *Sox9* экспрессируется в процессе хондрогенеза начиная со стадии стволовых клеток; регулирует дифференцировку на стадии прехондроцитов, ранних хондроцитов, хондроцитов ростовых пластинок, хондроцитов суставного хряща – то есть практически все стадии дифференцировки. Предполагается, что в столбчатых хондроцитах SOX9 подавляет экспрессию *Coll0a1*, а в прегипертрофированных и гипертрофированных хондроцитах является необходимым для экспрессии *Coll0a1*. Кроме того, SOX9 поддерживает синтез агрекана в зрелом суставном хряще [Liu C.-F., Samsa W.E., Zhou G., et al., 2017].

Гены *Sox5* и *Sox6* экспрессируются в хондроцитах совместно с *Sox9*. Структура и функции белков SOX5 и SOX6 схожи, так как они принадлежат к одному семейству – SOXD, но при этом имеют только 50% идентичности с SOX9, принадлежащему к семейству SOXE. Нокаут генов *Sox5* или *Sox6* приводит к нарушениям строения скелета средней степени тяжести у новорожденных мышей. Нокаут двух этих генов ведет к внутриутробной смерти плода в следствии хондродисплазии тяжелой степени [Liu C.-F., Lefebvre V., 2015].

Нокаут гена *Sox8* приводит к остеопении у мышей, но при этом пороки развития хрящевой ткани у них не отмечаются [Sock E., Schmidt K., Hermanns-Borgmeyer I., et al., 2001]. Белки SOXC (SOX4, SOX11, SOX12) важны для поддержания жизненного цикла МСК, индуцируют WNT-зависимую дифференцировку по остеобластной линии, а в хондрогенной

дифференцировке участвуют в качестве поддерживающих факторов [Bhattaram P., Penzo-Méndez A., Kato K., et al., 2014].

Белки семейства TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factors), включающие TCF7 (TCF1), TCF7L1 (TCF3), TCF7L2 (TCF4), LEF1, в отсутствие сигналов WNT-пути подавляют экспрессию генов. При классическом WNT-сигналинге коактиватор транскрипции  $\beta$ -катенин транслоцируется в ядро, связывается с TCF/LEF факторами и превращает их в активаторы транскрипции [Liu J., Xiao Q., Xiao J., et al., 2022].

Показана экспрессия TCF7L2 в гипертрофированных хондроцитах, где он взаимодействует с RUNX2 [Mikasa M., Rokutanda S., Komori H., et al., 2011]. Кроме того, TCF7L2 экспрессируется при первичном ОА, развившемся на неповрежденной суставной поверхности, и потенцирует апоптотические эффекты NF- $\kappa$ B [Ma B., Zhong L., van Blitterswijk C.A., et al., 2013].

Белки семейства RUNX (также называются CBFs, core-binding factors) состоят из  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединиц, кодируемых генами RUNX1/CBFA2, RUNX2/CBFA1, RUNX3/CBFA3 и CBF $\beta$ . Аффинность  $\alpha$ -субъединицы, которая связывается с ДНК по мотиву [A/G]ACC[A/G]CA, выше, чем у субъединицы  $\beta$ . Белки RUNX2 и RUNX3 являются ключевыми регуляторами хондрогенеза. Мыши с нокаутом гена *Runx2* погибают при рождении. У них не происходит внутримембранной и эндохондральной оссификации и наблюдается отсутствие прегипертрофированных и гипертрофированных хондроцитов. Взаимодействия между RUNX2 и RUNX3 могут быть важны для формирования зрелых хондроцитов. Отсутствие экспрессии *Runx3* не влияло на формирование ростовой пластинки кости, но полный нокаут генов *Runx2* и *Runx3* приводил к отсутствию созревающих хондроцитов у мышей. RUNX2 и RUNX3 – активаторы транскрипции, а их мишенями являются маркеры прегипертрофированных (*Ihh*), гипертрофированных (*Coll10a1*) и терминальных (*MMP13*) хондроцитов [Wu H., Whitfield T.W., Gordon J.A.R., et al., 2014]. Экспрессия *Runx1* была обнаружена в суставной хрящевой ткани у взрослых при ОА [LeBlanc K.T., Walcott M.E., Gaur T., et al., 2015].

Белки MEF2 относятся к транскрипционным факторам с доменами MADS и являются активаторами транскрипции, вовлечёнными в процесс развития мышц, но также участвуют и в других процессах, включая хондрогенез [Potthoff M.J., Olson E.N., 2007]. Белки MEF2C и MEF2D коэкспрессируются в ростовой пластинке, и совместно с RUNX2 и SOX9 усиливают экспрессию *Ihh* и *Col10a1* в прегипертрофированных и гипертрофированных хондроцитах [Du P., Wang W., Bhattaram P., et al., 2012; Arnold M.A., Kim Y., Czubyrt M.P., et al., 2007].

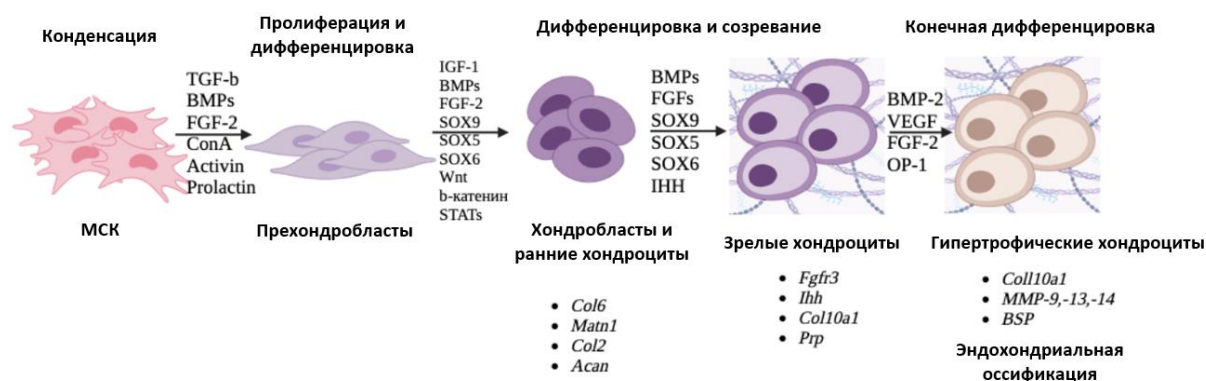
Семейства белков NF-κB и NFATC относятся к ТФ с RHD-доменами и включают в себя несколько хондрогенных белков. Члены семейства NF-κB связывают ДНК по мотиву GGG[A/G]N[T/C][T/C][T/C]CC. Активация белков NF-κB индуцируется стрессовыми и воспалительными сигналами, в результате чего происходит подавление экспрессии *Sox9* и запускаются катаболические процессы в хондроцитах. Один из белков семейства, RELA/p65, напротив, экспрессируется в здоровых МСК и ростовой пластинке, и *in vitro* способствует выживанию и пролиферации клеток [Wu S., Morrison A., Sun H., et al., 2011].

7 белков семейства STAT регулируют пролиферацию, дифференцировку и выживаемость клеток. Модулируемые рецептором фактора роста фибробластов FGFR3, STAT1 и STAT5 ингибируют пролиферацию столбчатых хондроцитов [Legeai-Mallet L., Benoist-Lasselain C., Munnich A., et al., 2004]. STAT5 опосредует действие гормона роста на ростовую пластинку. Стимуляция STAT3 *in vivo* про- или противовоспалительными цитокинами приводит к изменению дифференцировки хондроцитов [Wu S., Morrison A., Sun H., et al., 2011].

К другим молекулярным факторам, индуцирующим хондрогенную дифференцировку МСК, относятся: активин, остеогенный протеин-1, GDF-5, IGF-1, пролактин, IL-1β, Ctg61, HB-GAM, соматотропин, конкавалин А [Волк М.В., Лобанок Е.С., Волотовский П.А., 2011].



Таким образом, хондрогенез обусловлен конденсацией и дифференцировкой МСК в несколько этапов, каждый из которых находится под контролем ТФ. Хондробласты, дифференцирующиеся в ранние, а затем в зрелые хондроциты, синтезируют компоненты ВКМ, характерного для хрящевой ткани, в частности коллаген II и VI типов (Col2 и Col6), агрекан (Acan) и матрилин 1 (Matn1). Маркерами зрелых хондроцитов являются Ihh, Fgfr3 и Coll10a1, а гипертрофическая зона характеризуется экспрессией коллагена X типа, кальцификацией и ремоделированием матрикса с участием матриксных металлопротеаз MMP-9, -13, -14. Васкуляризация, опосредованная фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и рецепторами VEGF, необходима для преобразования невакуляризированной ткани в кость. Все эти процессы регулируются FGF, TGF, BMP, сигнальным путем Wnt и ТФ Sox, Ihh (рис. 3).



**Рисунок 3.** Хондрогенная дифференцировка МСК: сигнальные пути и молекулярные маркеры.

### 1.2.3. Пептиды, стимулирующие хондрогенную дифференцировку

Разнообразие различных молекулярных факторов, участвующих в хондрогенной дифференцировке МСК, открывает широкие возможности ее регуляции. В существующих протоколах хондрогенной дифференцировки в среду для культивирования обычно добавляют ростовые факторы, в основном TGF- $\beta$ , BMP, IGF и FGF. Влияние ростовых факторов на хондрогенез может варьироваться в зависимости от дозы, типа клеток и стадии их

дифференцировки. Однако, стимуляция МСК с помощью ростовых факторов обычно требует их высокой концентрации и многократного введения. Это может вызывать побочные эффекты [Yu D.-A., Han J., Kim B.-S., 2012].

Более безопасным и физиологичным способом стимуляции дифференцировки МСК в хондроциты является применение пептидов. Одним из распространенных подходов к имитации физиологической среды является функционализация поверхностей биоматериалов с помощью пептидов, полученных из ВКМ, способных рекрутировать стволовые клетки и запускать их дифференцировку. Пептиды различной длины применяют в качестве каркасных биоматериалов и для запуска разнообразных сигнальных путей при тканевой инженерии хрящевой ткани [Yu C.-Y., Huang W., Li, Z.-P., et al., 2016].

В2А – синтетический пептид, модулирующий активность фактора BMP-2. Его аминокислотная последовательность получена на основе структуры BMP-2 и включает три домена: гепарин-связывающий, гидрофобный и мишень для рецептора [Verrecchio A., Germann M.W., Schick B.P., et al., 2000]. Пептиды В2А связываются с рецепторами BMP I и II типа и индуцируют дифференцировку хондроцитов и восстановление хрящевой ткани. В культурах стволовых клеток мыши добавление пептида В2А индуцировало экспрессию 11 генов, связанных с сигнальными путями хондрогенной дифференцировки: *Fgf*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Smad1*, *Smad4*, *Twist1*, *Coll1a1*, *Col3a1*, *Phex*, *Serpin1*, *Bmp1*. Добавление пептида В2А активировало пролиферацию хондроцитов в культуре и приводило к повышению компонентов ВКМ (сульфатированного гликозаминогликана и коллагена). В модели ОА коленного сустава у крыс введение В2А в синовиальное пространство усиливало восстановление хряща по сравнению с контролем без введения В2А [Lin X., Shanmugasundaram S., Liu Y., et al., 2012].

Протеин казеинкиназа II (СК2) взаимодействует с рецептором BMP типа Ia (BMPRIa). Связывание BMP2 с BMPRIa высвобождает СК2 и активирует путь Smad1/5/8. Были синтезированы три пептида СК2.1, СК2.2 и СК2.3,

которые ингибируют связывание СК2 с BMPRIa и активируют сигнальный путь BMP в отсутствие лиганда BMP. Показано, что СК2.2 и СК2.3 запускают различные пути дифференцировки клеток линии C2C12: добавление СК2.3 приводило к остеогенезу, а СК2.2 – к адипогенезу и остеогенезу. Кроме того, СК2.3 и СК2.2 активируют сигнальный путь Smad. Изначально эти пептиды изучались в качестве факторов, регулирующих остеогенез. В настоящее время установлено, что они могут активировать неканонические сигнальные пути BMP. Таким образом, эти пептиды могут быть индукторами хондрогенной дифференцировки. Добавление пептида СК2.1 к клеткам C3H10T1/2 приводило к усилению ими синтеза протеогликанов и экспрессии коллагена II типа. Инъекционное введение пептида СК2.1 стимулировало образование суставного хряща у мышей. При этом, в отличие от BMP2, СК2.1 не индуцирует экспрессию коллагена X, что означает указывает на возможность образования хрящевой ткани без ее гипертрофии [Akkiraju H., Bonor J., Nohe A., 2017].

Пептид SPPEPS (Ser-Pro-Pro-Glu-Pro-Ser) был разработан на основе агрекана и TGF- $\beta$ 3. SPPEPS является участком ассоциированного с латентностью пептида LAP (лиганда для интегринов) в области N-конца TGF- $\beta$ 3. Известно, что интегрины опосредуют сигнальные взаимодействия между клетками и ВКМ и играют важную роль в регенерации хрящевой ткани. Добавление пептида SPPEPS в КМ-МСК крыс приводило к повышению экспрессии гена коллагена II типа и транскрипционного фактора *Sox9*. SPPEPS способен активировать и другие гены, связанные с хондрогенезом, включая *ENPP1* и *CLIC4* [Mahzoon S., Townsend J.M., Lam T.N., et al., 2019].

KLD-12 представляет собой самособирающийся пептид (Self-Assembling Peptide, SAP) из 12 аминокислотных остатков (AcN-KLDLKLDLKLDL-CNH(2)). Продемонстрировано использование пептида KLD-12 для инкапсуляции хондроцитов в 3D-культуры, где инкапсулированные хондроциты сохраняли фенотип и продуцировали ВКМ с преобладанием коллагена II типа. KLD также использовался для инкапсуляции и введения

МСК в межпозвонковое пространство. Продемонстрирована способность этих самособирающихся пептидных каркасов индуцировать хондрогенную дифференцировку стромальных клеток костного мозга КМ-МСК. Гидрогель, формируемый KLD-12, может заполнять костно-хрящевые дефекты *in situ* на всю толщину и способствовать восстановлению хряща [Tripathi J.K., Pal S., Awasthi B., et al., 2015; Sun J., Zheng Q., 2009].

Добавление к пептиду KLD-12 пептид-миметика N-кадгерина также приводит к образованию гидрогеля, в котором инкапсулированные МСК человека демонстрируют повышенную экспрессию хондрогенных маркеров и отложение специфического для хряща ВКМ, богатого протеогликаном и коллагеном II типа. В случае гидрогелей, образованных при участии пептид-миметика N-кадгерина, индукция хондрогенеза в МСК человека происходит при подавлении сигнального пути Wnt. Этот эффект достигается за счет снижения транслокации  $\beta$ -катенина в ядро и уменьшения активности комплекса транскрипции  $\beta$ -катенин/LEF-1/TCF [Li R., Xu J., Wong D.S.H., et al., 2017].

Один из способов культивирования МСК – добавление их в альгинатный раствор, являющийся матрицей для образования сфер при 3D-культивировании. Пептиды клеточной адгезии способны улучшать взаимодействие клеток с молекулами матрицы. К таким пептидам относят RGD (Arg-Gly-Asp) и пептид-миметик фибронектина. В RGD-иммобилизованных альгинатных каркасах активация как Smad-зависимого (SMAD2), так и Smad-независимого (ERK1/2) сигнальных путей, индуцированная TGF- $\beta$ 1, была более выраженной по сравнению с культурами без добавления RGD [Re'em T., Tsur-Gang O., Cohen S., 2010]. Было показано, что альгинаты, ковалентно связанные с RGD, инициируют взаимодействия между альгинатными гидрогелями и клетками в культуре [Andersen T., Auk-Emblem P., Dornish M., 2015].

Проведено сравнительное изучение культивирования КМ-МСК человека с миметиком тройной спирали коллагена, пептидом GFOGER (GPC(GPP)5-

GFOGER-(GPP)5GPC-NH<sub>2</sub>), и пептидом RGD в разлагаемых гелях. Пептид GFOGER повышал пролиферативную активность и стимулировал синтез коллагена II типа в МСК. Добавление пептидов GFOGER и RGD увеличивало продукцию гликозаминогликанов МСК [Mhanna R., Öztürk, E., Vallmajó-Martin Q., et al., 2014].

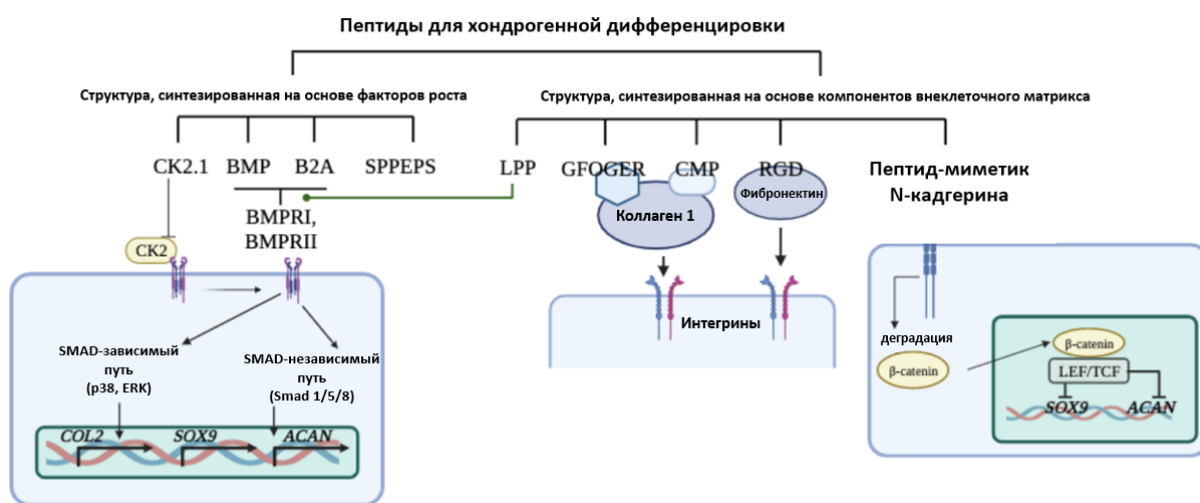
Пептид LPP представляет собой протеолитический N-концевой фрагмент линкового белка, содержащий 16 аминокислотных остатков (DHLSDNYTLDHDAIH). LPP – стабилизатор основных структурных компонентов хряща: агрекана и гиалуроновой кислоты. LPP способствует продукции ВКМ в межпозвоночном диске, повышая экспрессию SOX9, агрекана и коллагена II типа. Это происходит посредством взаимодействия пептида LPP с рецептором BMP II типа, что опосредует передачу сигналов по пути Smad и приводит к экспрессии BMP-4 и BMP-7. BMP-4 и BMP-7 усиливают передачу сигналов пути Smad1/5 через рецептор BMP I типа, способствуя экспрессии транскрипционного фактора SOX9 и регулируемых им генов агрекана и коллагена II типа. Предполагается, что LPP может быть терапевтической заменой прямого введения BMP для лечения дегенерации межпозвоночных дисков [Wang Z., Weitzmann M.N., Sangadala S., et al., 2013].

Пептиды-миметики коллагена (collagen mimetic peptides, CMPs) также изучались в качестве стимуляторов хондрогенной дифференцировки МСК. В частности, комбинация CMP с диакрилатом полиэтиленоксида (PEODA) формирует гибридный каркас полимер-пептид, при добавлении которого в культуру клеток МСК происходит активация синтеза компонентов ВКМ: гликозаминогликанов и коллагена. МСК, культивируемые в гидрогеле с добавлением CMP/PEODA, имели более низкий уровень экспрессии коллагена X типа – маркера гипертрофии [Lee H.J., Yu C., Chansakul T., Hwang N.S., et al., 2008]. Однако, судя по небольшому количеству публикаций про CMP и их индукции хондрогенеза МСК, этот метод не получил большого распространения.

## Заключение к разделу 1.2

Методы тканевой биоинженерии открывают новые возможности терапевтических подходов к регенерации хрящевой ткани при ОА. Понимание молекулярных механизмов хондрогенеза необходимо для улучшения существующих протоколов хондрогенной дифференцировки МСК. Поиск биологически активных веществ, способных индуцировать хондрогенную дифференцировку МСК, является актуальной задачей современной молекулярной медицины. Разработка эффективных и безопасных стимуляторов дифференцировки хондроцитов на основе пептидов позволит повысить качество жизни пациентов старших возрастных групп с ОА.

Установлено, что индукция хондрогенеза МСК опосредуется синтетическими пептидными молекулами различной длины и функциональности. Часть из них синтезирована на основе структуры ТФ, часть – на основе молекул ВКМ (рис. 4).



**Рисунок 4.** Молекулярные механизмы пептидной регуляции хондрогенной дифференцировки МСК.

Таким образом, хондрогенную дифференцировку МСК можно регулировать, комбинируя различные подходы, в зависимости от необходимого результата.

Пептиды BMP и B2A взаимодействуют с рецепторами BMP. B2A запускает преимущественно SMAD-независимый сигнальный путь, в то время

как BMP усиливает SMAD-зависимую передачу сигнала. Кроме того, участок фосфорилирования фермента CK2 – пептид CK2.1 также активирует сигналинг BMP. В результате повышается экспрессия коллагена II типа, транскрипционного фактора Sox9 и агрекана, что ведет к хондрогенной дифференцировке МСК и усилению хондрогенеза. Пептиды GFOGER и CMP образуют комплекс с коллагеном I типа, а пептид RGD – с фибронектином. Эти комплексы взаимодействуют с различными цепями интегринов, усиливая межклеточные взаимодействия, необходимые для дифференцировки и пролиферации хондроцитов. Пептид-миметик N-кадгерина обуславливает деградацию бета-катенина в цитоплазме, в результате чего снижается его транслокация в ядро и транскрипционная активность комплекса b-катенин/LEF-1/TCF, ингибирующего экспрессию Sox9 и агрекана.

Представленные данные указывают на перспективность дальнейших исследований биологически активных пептидов в разработке средств, стимулирующих дифференцировку хондроцитов и способствующих репарации хрящевой ткани при ОА.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Дизайн эксперимента. Характеристика исследуемых клеточных линий

В качестве объектов в диссертационном исследовании были использованы первичная культура хондроцитов, полученных от беспородных белых крыс и МСК человека линии SC5-MSC.

Первичную культуру хондроцитов получали из межпозвонковых дисков молодых (3 мес.) и старых (20 мес.) беспородных белых крыс. Хрящи межпозвонковых дисков нарезают на фрагменты размером около 1 мм<sup>2</sup> и помещают в чашки Петри диаметром 35 мм с адгезионным покрытием в среду  $\alpha$ MEM (модифицированная среда Игла, Sigma, США) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров (HyClone, США) и гентамицина (50 мкг/мл). Через 4-7 суток из фрагментов хряща начинали выселяться клетки. При достижении клетками 80% монослоя их пассировали с помощью смеси трипсина и версена в соотношении 1:3 по ранее описанной методике [Сахенберг Е.И., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П., 2014]. Клетки на 4 пассаже разделяли на 7 групп: 1 – контроль, 2, 3, 4 – добавление пептида AED в концентрациях 20 нг/мл, 200 нг/мл и 2000 нг/мл, 5, 6, 7 – добавление ППКХ в концентрациях 20 нг/мл, 200 нг/мл и 2000 нг/мл. Ранее в исследовании биологической активности пептида AED в культурах фибробластов кожи при их репликативном старении эффективной оказалась концентрация 400 нг/мл [Гутоп Е.О., Линькова Н.С., Фридман Н.В., и др., 2022]. Пептид AED в концентрации 20 нг/мл стимулировал синтез факторов транскрипции в мезенхимальных стволовых клетках человека при стационарном и репликативном старении [Ashapkin V., Khavinson V., Shilovsky G., et al., 2020]. 4 пассаж были выбран для исследования, т.к. на этом этапе репарационные системы клетки успевают восстановить их функциональную активность после повреждений.

МСК человека линии SC5-MSC были доставлены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Санкт-Петербург,



Россия). Эта линия фибробластоподобных клеток получена из эмбриональных стволовых клеток человека. Исследуемая линия имеет ограниченный срок жизни - до 59 удвоений клеточной популяции не наблюдается снижения пролиферативной активности. Она обладает фенотипом и способностью к мультипотентной дифференцировке, характерными для МСК, т.е. экспрессия поверхностных антигенов, характерных для мезенхимных стволовых клеток: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC; отсутствие экспрессии антигенов CD34 и HLA-DR, а также направленная дифференцировка в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. SC5-MSC является источником большого количества генетически однородного клеточного материала, необходимого для проведения разнообразных исследований. Характеристики данной линии свидетельствуют о широких возможностях ее для использования в регенеративной медицине, кроме того, в исследованиях клеточной биологии и биотехнологии.

Клетки выращивали в среде  $\alpha$ -MEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Пересев культуры осуществляли, используя раствор трипсина (0,25%) и версена (0,02%) (1:3), кратность посева 1:4, плотность 4,0-5,0 x 10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Клетки культивировали до 18 пассажа и разделяли на 5 групп: 1 – контроль, 2, 3 – добавление пептида AED в концентрациях 200 нг/мл и 2000 нг/мл, 4, 5 – добавление ППКХ в концентрациях 200 нг/мл и 2000 нг/мл. В ранее проведенном исследовании пролиферативной активности культур хондроцитов было показано, что указанные концентрации пептида AED и ППКХ являются наиболее эффективными. На 18 пассаже наблюдали статистически значимое снижение скорости удвоения клеток. Это указывает на репликативное старение МСК [Khokhlov A.N., 2013; Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., et al., 2014]. Таким образом, клетки 18 пассажа рассматривались как «старые», т.е. подвергнутые репликативному старению.

## **2.2. Построение кривой клеточного роста**

Для построения кривой роста клетки первичной культуры хондроцитов, полученных от беспородных белых крыс, рассеивали в 24-луночные планшеты. В каждую ячейку планшета добавляли клетки в концентрации 20 000 на 2 мл. Среду и пептиды добавляли таким образом, чтобы общий объем раствора в ячейке составлял 2 мл. В контрольных образцах культур клеток вместо пептида добавляли аналогичное количество питательной среды. На 2-5 сутки культивирования клетки снимали с поверхности ячеек планшетов трипсин-версеном. Подсчет клеток осуществляли из расчета на 1 мл в камере Горяева в 16 квадратах (по полученным данным рассчитывали среднее значение клеток в квадрате).

## **2.3. Полимеразная цепная реакция**

Для оценки экспрессии генов, кодирующих белки SOX9, агрекан, коллаген II типа, COMP в МСК человека линии SC5-MSC применяли метод постановки ПЦР. Суммарную РНК выделяли из клеток с использованием раствора для стабилизации РНК IntactRNA («Евроген», Москва). Выделение РНК осуществляли, используя набор RNeasy MiniKit («Qiagen», FRG). Первую нить кДНК синтезировали с Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific Inc», USA), используя 100 нг РНК на 20 мкл реакционной смеси. Полученную кДНК использовали как матрицу для количественной ПЦР из расчета 1 мкл на 24 мкл реакционной смеси. Количественную ПЦР проводили, используя набор для амплификации qPCRmix-HS SYBR+ROX («Евроген», Россия). Уровень экспрессии относительно референсного гена GAPDH определяли методом  $\Delta\Delta Cq$ . В экспериментах использовали по три независимых образца клеток каждой группы (биологические параллели). Для каждого образца кДНК проводили минимум три параллельные реакции в соседних лунках прибора (технические параллели). Далее экспериментальные значения сравнивали попарно с контрольными по двухстороннему критерию Стьюдента. Достоверными

считали различия при  $p < 0.01$ . Данные представляли в виде  $m \pm 2SD$ , где  $m$  – среднее значение,  $SD$  - стандартное отклонение.

#### **2.4. Иммуоцитохимическое исследование и морфометрия**

Для сравнительного анализа синтеза белков, составляющих SASP хондроцитов, в первичной культуре хондроцитов, полученных от беспородных белых крыс было проведено иммуоцитохимическое окрашивание культур. Для пермеабиллизации клеточных мембран в течение 10 минут применяли 0,1% Тритон X-100 (Биолот, Россия), растворенный в фосфатно-солевом буфере. Культуры хондроцитов инкубировали в 1% фосфатно-солевом буфере (pH 7,5) в течение 45 мин для блокировки неспецифического связывания антител. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 45 мин. при комнатной температуре. В работе использовали первичные моноклональные антитела к p16 (1:100), p21 (1:150), США).

Для сравнительного анализа синтеза белков, участвующих в хондрогенной дифференцировке, было также было проведено иммуоцитохимическое исследование МСК человека линии SC5-MSC. Использовали первичные моноклональные антитела к SOX9 (1:150), агрекану (1:100), коллагену II типа (1:100) и COMP (1:150) фирмы Thermo Fisher Scientific, США.

В обеих частях исследования ядра клеток докрашивали Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific, США). Зеленая и красная флуоресценция характеризовала экспрессию исследуемых молекул (инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 647 (1:2000, Thermo Fisher Scientific, США), в течение 45 мин при комнатной температуре, в темноте). Исследование проводили на конфокальном микроскопе LSM 710 (Zeiss GmbH, Германия). Микрофотографии анализировали с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США). В каждом случае просматривали 5 полей зрения при

увеличении 200. Площадь экспрессии рассчитывали, как отношение площади иммуноокрашенных клеток или их ядер к общей площади клеток или их ядер в поле зрения и выражали в %.

Количественный метод анализа результатов иммунофлуоресцентного окрашивания клеток широко распространен в молекулярно-биологических исследованиях и позволяет проводить более точное сравнение данных в исследуемых группах по сравнению с визуальной оценкой [Young K., Morrison H., 2018; Thomas N., Krishnapillai R., Bindhu P.R., Thomas P., 2019; Gutop E.O., Linkova N.S., Kozhevnikova E.O., et al., 2022].

## **2.5. Статистическая обработка данных и морфометрия**

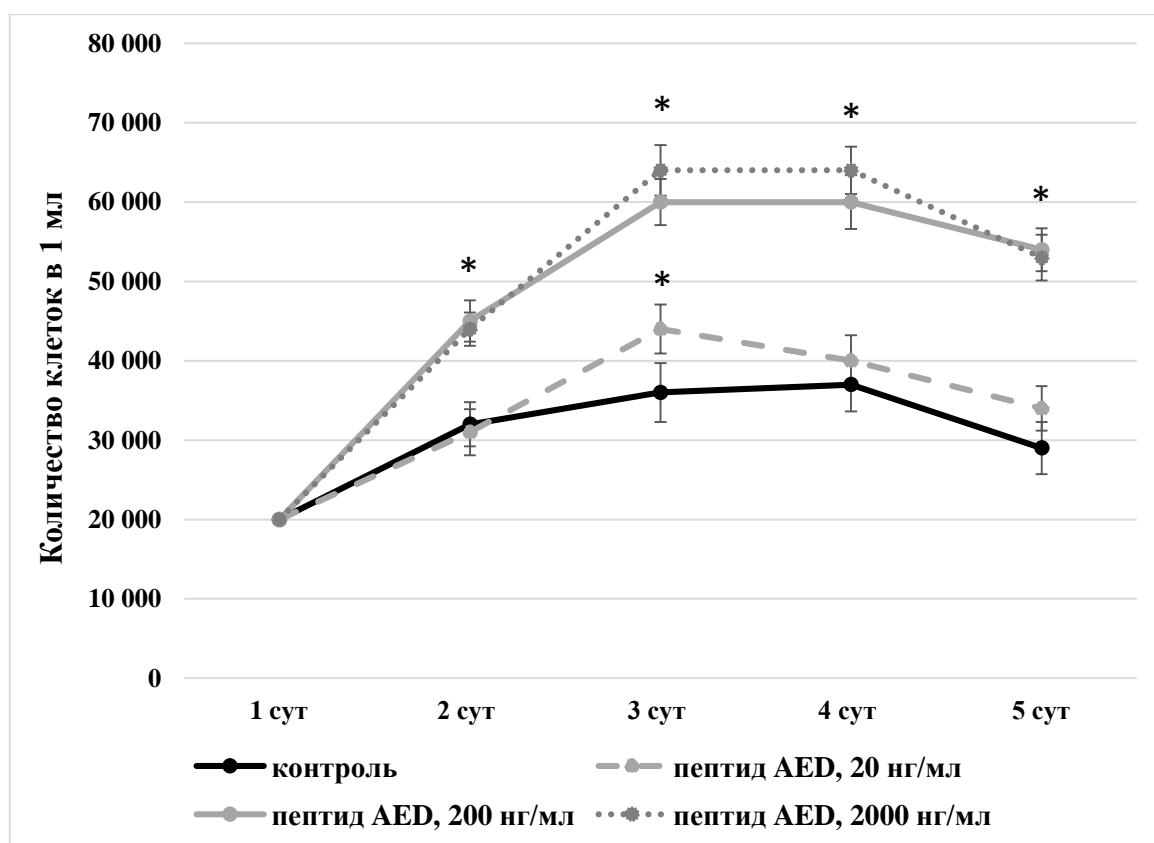
Статистическая обработка данных, полученных при изучении влияния пептида AED и ППКХ на экспрессию генов и синтез белков хондрогенной дифференцировки МСК человека при репликативном старении, включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала и проводилась в программе «Statistica 7.0». Для анализа вида распределения применяли критерий Шапиро-Уилка. Для проверки статистической однородности нескольких выборок использовали критерий Крускала-Уоллиса. Для попарного сравнения групп применяли t-критерий Стьюдента. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,01.

Статистическая обработка данных, полученных при оценке влияния ППКХ и входящего в его состав пептида AED на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых животных, включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки в программе Statistica 10.0. Для того, чтобы подтвердить нормальное распределение данных в выборке, использовали критерий Шапиро-Уилка. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,01.

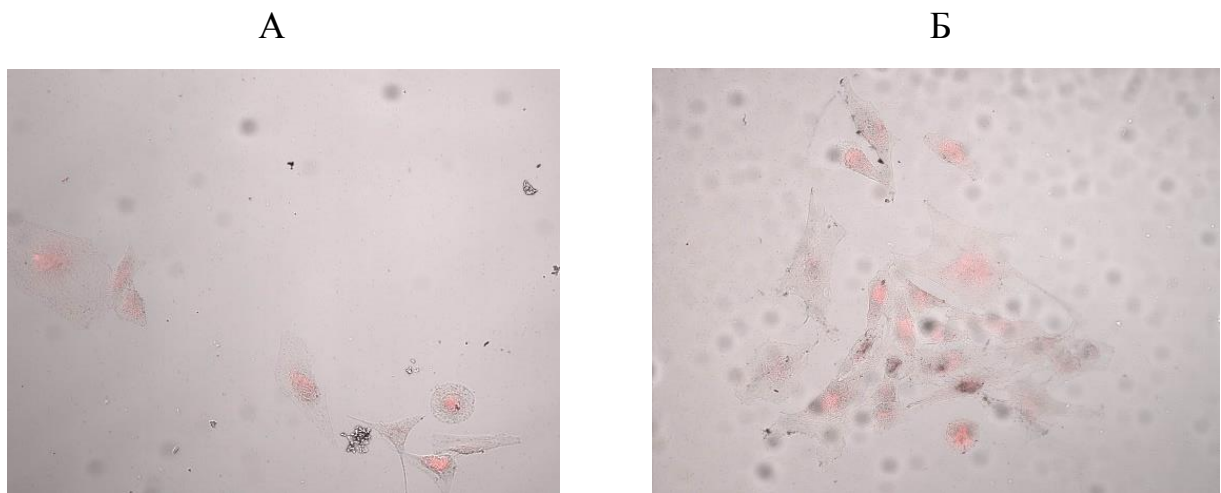
## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Влияние пептидов на пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых крыс

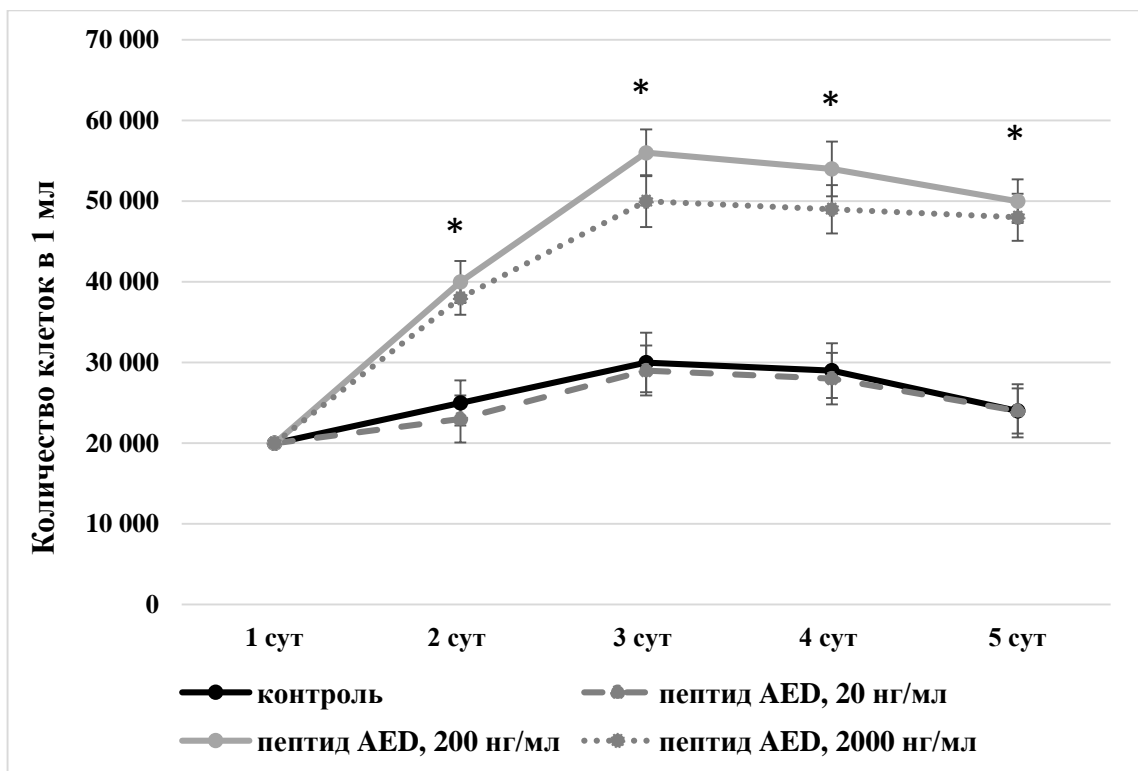
Пептид AED в концентрации 20 нг/мл на 22% статистически значимо повышал пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых крыс, только на 3 сутки культивирования. В концентрациях 200 и 2000 нг/мл пептид AED оказывал одинаковый стимулирующий эффект на пролиферацию хондроцитов молодых животных. На 2, 3, 4 и 5 сутки культивирования пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл повышал количество клеток соответственно в 1,4, 1,8, 1,7 и 1,8 раза по сравнению с контролем (рис. 5, 6).



**Рисунок 5.** Влияние пептида AED на рост культуры хондроцитов, полученной от молодых крыс. \* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем.



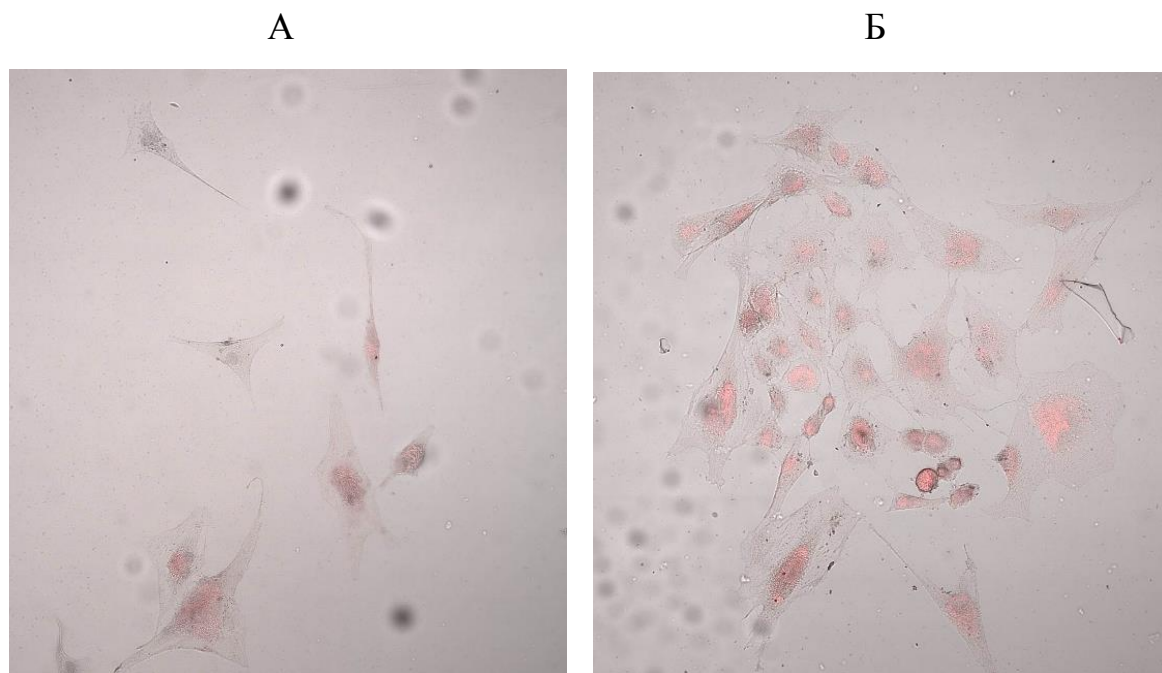
**Рисунок 6.** Влияние пептида AED в концентрации 200 нг/мл на рост культуры хондроцитов, полученной от молодых крыс. Световая прижизненная микроскопия, x200. А – контроль, Б – пептид AED.



**Рисунок 7.** Влияние пептида AED на рост культуры хондроцитов, полученной от старых крыс. \* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем.

Пептид AED в концентрации 20 нг/мл не оказывал влияния на пролиферацию хондроцитов, полученных от старых крыс. В концентрациях 200 и 2000 нг/мл пептид AED оказывал одинаковый стимулирующий эффект на пролиферацию хондроцитов старых животных. На 2, 3, 4 и 5 сутки культивирования пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл повышал

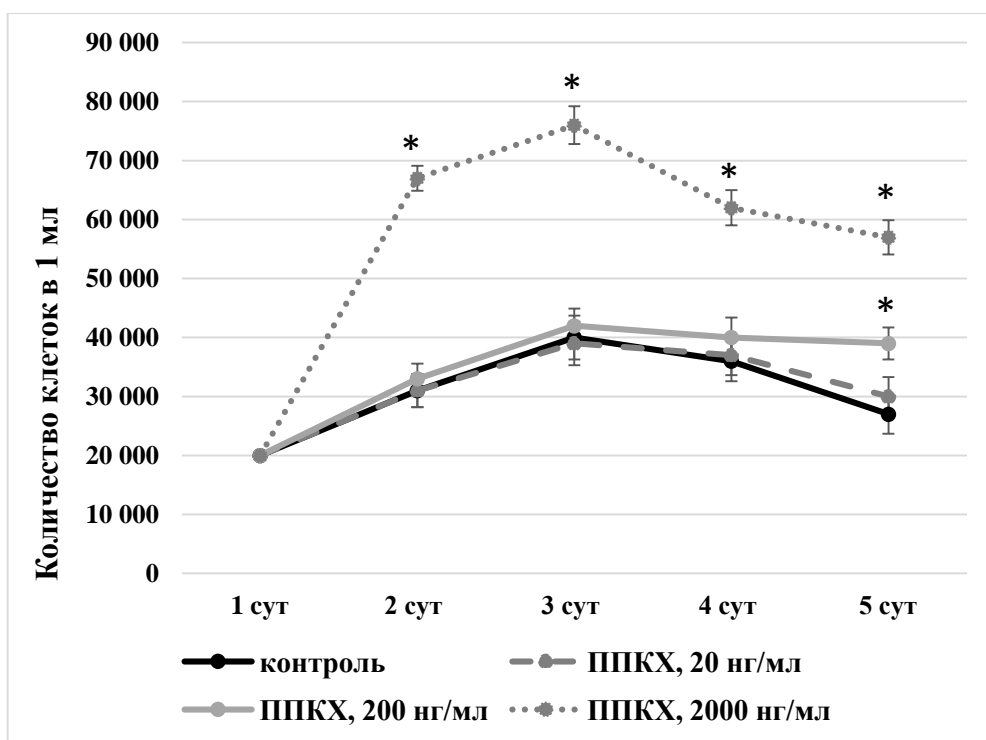
количество клеток соответственно в 1,6; 1,9; 1,9 и 2,1 раза по сравнению с контролем (рис. 7, 8).



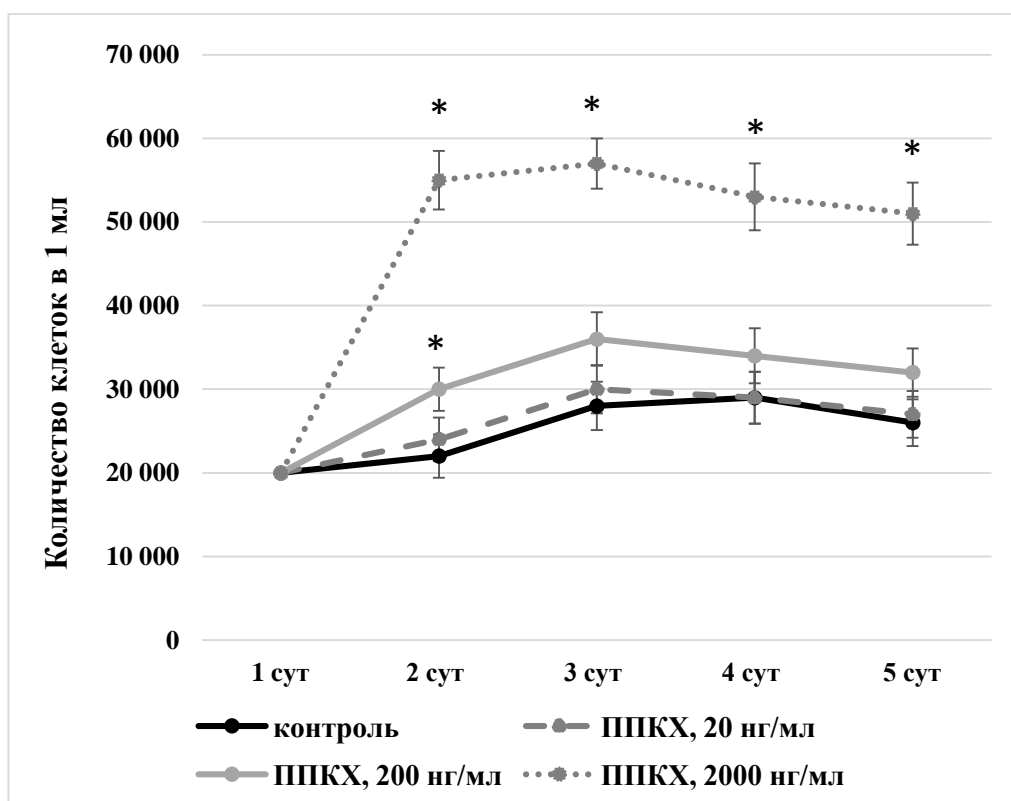
**Рисунок 8.** Влияние пептида AED в концентрации 200 нг/мл на рост культуры хондроцитов, полученной от старых крыс. Световая прижизненная микроскопия, x200. А – контроль, Б – пептид AED.

ППКХ в концентрации 200 нг/мл на 44% статистически значимо повышал пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых крыс, только на 5 сутки культивирования. В концентрации 2000 нг/мл ППКХ оказывал выраженный стимулирующий эффект на пролиферацию хондроцитов молодых животных. На 2, 3, 4 и 5 сутки культивирования ППКХ в концентрации 2000 нг/мл повышал количество клеток соответственно в 2,2; 1,9; 1,7 и 2,1 раза по сравнению с контролем (рис. 9).

ППКХ в концентрации 200 нг/мл достоверно на 36% повышал пролиферацию хондроцитов, полученных от старых крыс, на 2 сутки культивирования. В концентрации 2000 нг/мл ППКХ оказывал сильный стимулирующий эффект на пролиферацию хондроцитов старых животных. На 2, 3, 4 и 5 сутки культивирования ППКХ в концентрации 2000 нг/мл повышал количество клеток соответственно в 2,5; 2; 1,8 и 2 раза по сравнению с контролем (рис. 10).



**Рисунок 9.** Влияние полипептидного комплекса хрящевой ткани (ППКХ) на рост культуры хондроцитов, полученной от молодых крыс. \* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем.



**Рисунок 10.** Влияние полипептидного комплекса хрящевой ткани (ППКХ) на рост культуры хондроцитов, полученной от старых крыс. \* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем.

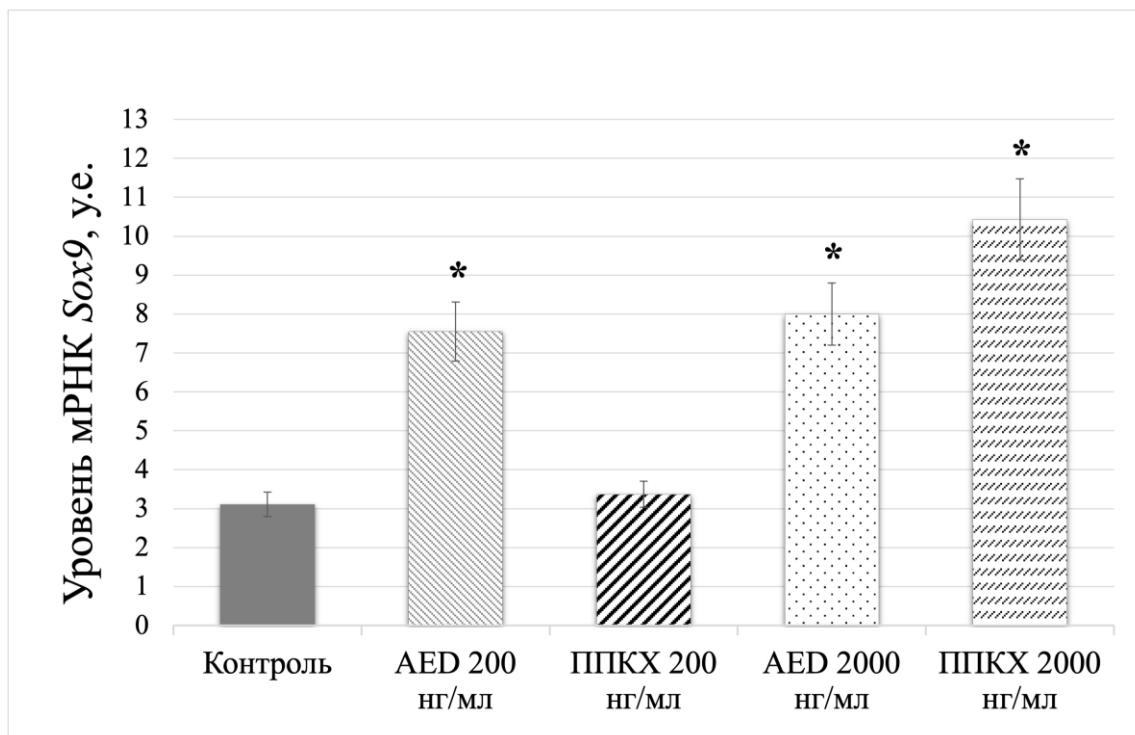


По результатам исследования влияния пептида AED и ППКХ на пролиферацию хондроцитов крыс, полученных от молодых и старых животных, для дальнейшего изучения были выбраны две эффективные концентрации исследуемых веществ: 200 нг/мл и 2000 нг/мл.

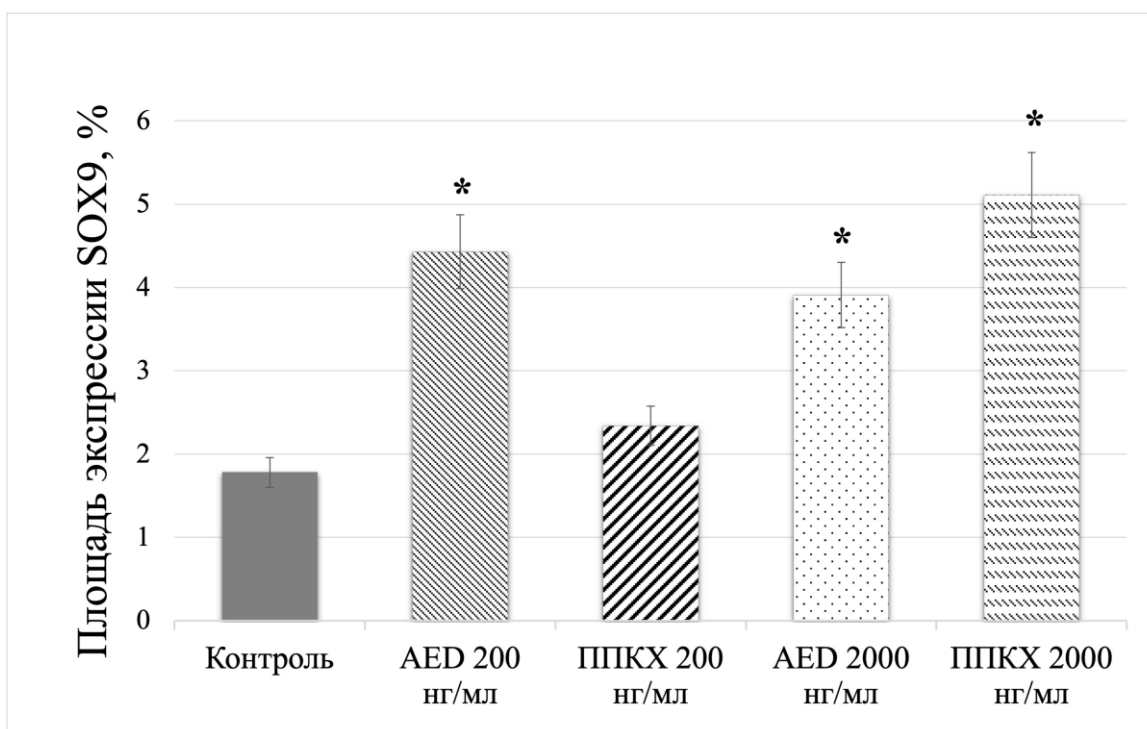
### **3.2. Влияние пептидов на хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток человека при репликативном старении**

Установлено, что при добавлении в культуру SC5-MSC пептида AED в концентрации 200 нг/мл на 18-м пассаже (модель репликативного старения) происходит повышение уровня мРНК *Sox9* в 2,4 раза по сравнению с контрольными культурами. Пептид AED в концентрации 2000 нг/мл повышает уровень мРНК *Sox9* в МСК при их репликативном старении в 2,6 раза по сравнению с контролем. ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывает значимого влияния на уровень мРНК *Sox9* в клетках SC5-MSC, а в концентрации 2000 нг/мл вызывает статистически значимое увеличение уровня этого показателя в 3,4 раза по сравнению с контролем (рис. 11А). Схожая тенденция наблюдалась и для синтеза белка SOX9 клетками SC5-MSC, оцениваемая по параметру площади экспрессии. Пептид AED в концентрациях 200 нг/мл и 2000 нг/мл повышает площадь экспрессии SOX9 в МСК при репликативном старении в 2,5 и 2,2 раза соответственно. ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывает влияния на площадь экспрессии SOX9, а в концентрации 2000 нг/мл увеличивает площадь экспрессии SOX9 в 2,9 раза при старении МСК (рис. 11Б). Таким образом, пептид AED индуцирует экспрессию гена и синтез белка SOX9 в МСК человека при старении *in vitro* в обеих исследуемых концентрациях. ППКХ индуцирует экспрессию гена и синтез белка SOX9 в стареющих МСК более выражено по сравнению с пептидом AED, но только в концентрации 2000 нг/мл.

А



Б

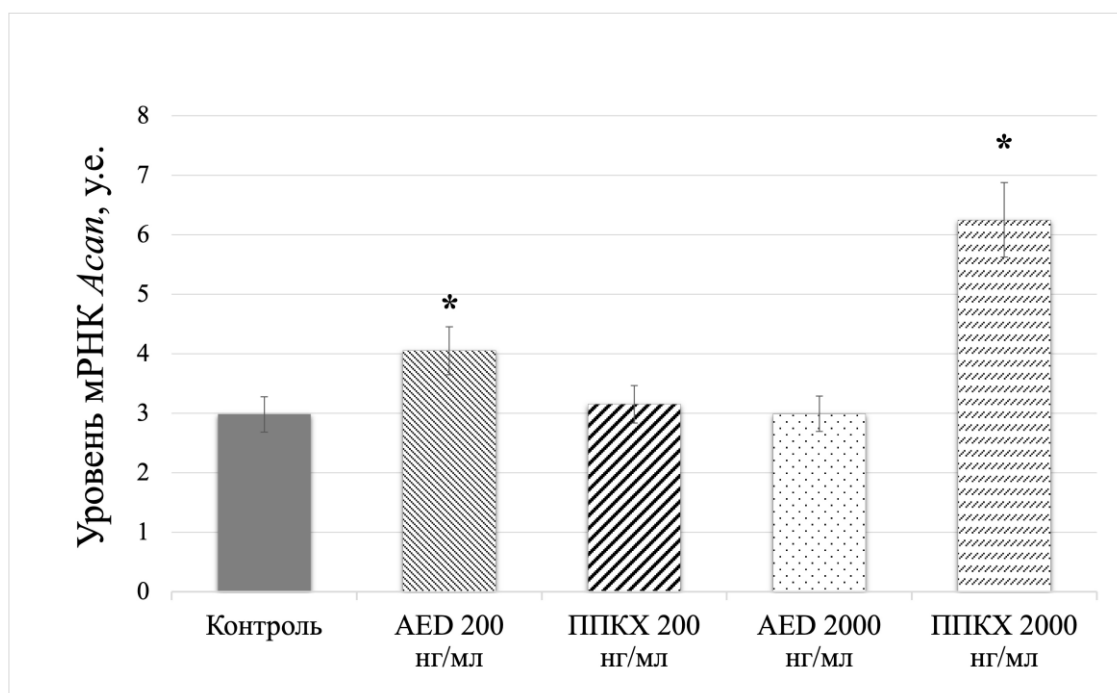


**Рисунок 11.** Уровень мРНК *Sox9* (А) и площадь экспрессии SOX9 (Б) в МСК человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях. \*  $p < 0,01$  – по сравнению с контролем.

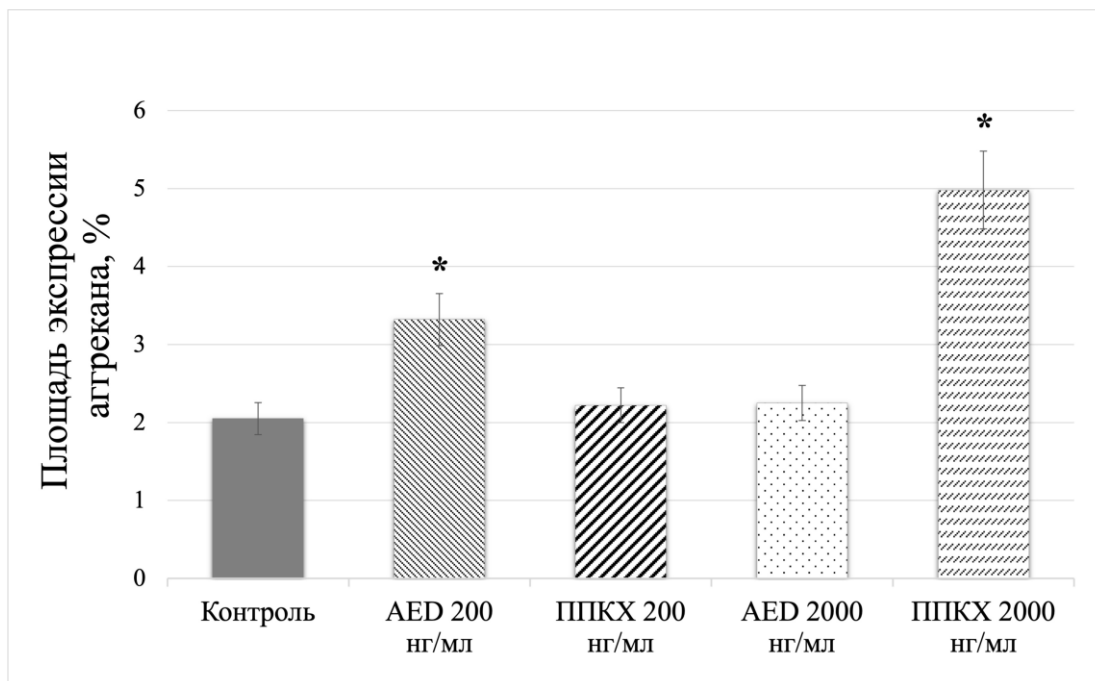
При добавлении в культуру клеток SC5-MSC при репликативном старении пептида AED в концентрации 200 нг/мл происходит статистически значимое

повышение уровня мРНК агрекана в 1,4 раза по сравнению с контролем. При этом добавление пептида AED в концентрации 2000 нг/мл и ППКХ в концентрации 200 нг/мл не влияет на этот показатель в МСК человека при их старении. ППКХ в концентрации 2000 нг/мл вызывает повышение уровня мРНК агрекана в стареющих МСК в 2,1 раза по сравнению с контролем (рис. 12А). Такая же зависимость проявляется и при определении синтеза белка агрекана клетками SC5-MSC. Добавление пептида AED в концентрации 200 нг/мл и ППКХ в концентрации 2000 нг/мл вызывает увеличение площади экспрессии агрекана соответственно в 1,6 и 2,4 раза по сравнению с контролем в МСК в модели репликативного старения. В то же время пептид AED в концентрации 2000 нг/мл и ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывают влияния на синтез агрекана (рис. 12Б). Таким образом, действие пептида AED и ППКХ на экспрессию гена и синтез белка агрекана отличаются от рассмотренного выше действия этих комплексов на белок SOX9 при репликативном старении МСК человека. Наблюдается зависимость эффекта от концентрации, причем для AED наиболее эффективной оказалась меньшая концентрация (200 нг/мл), а для ППКХ – большая (2000 нг/мл).

А



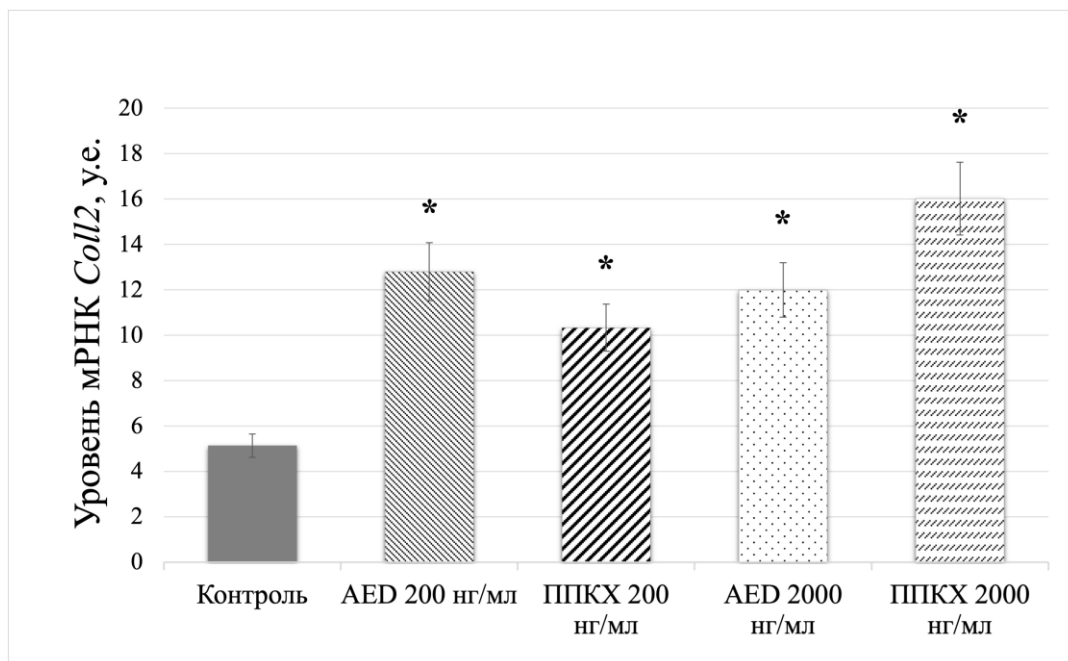
## Б



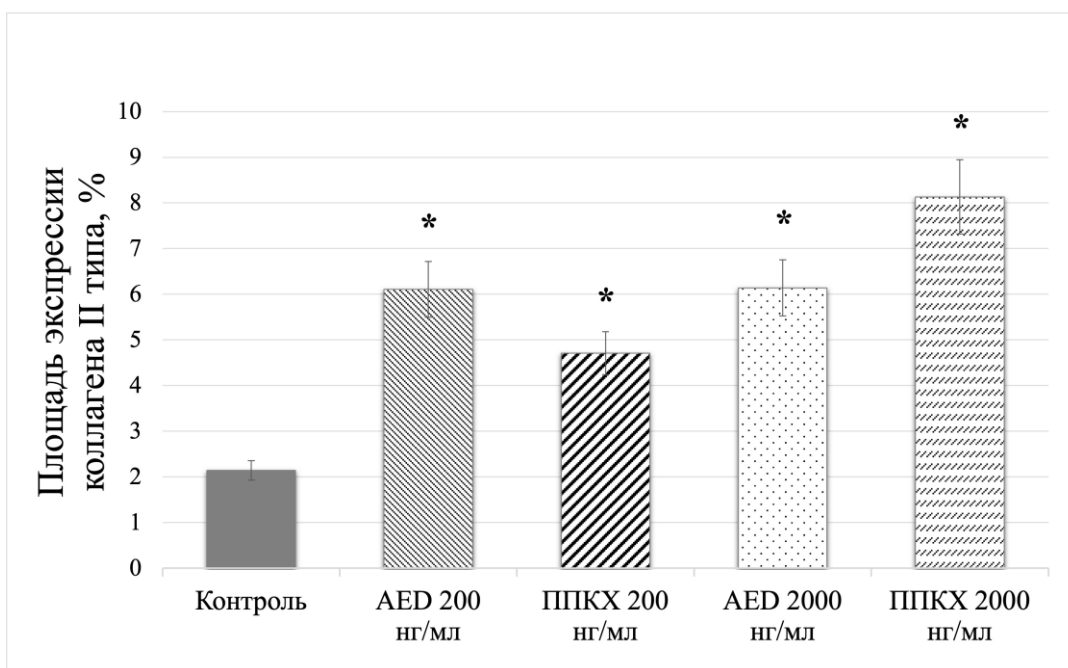
**Рисунок 12.** Уровень мРНК (А) и площадь экспрессии (Б) агрекана в МСК человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях. \*  $p < 0,01$  – по сравнению с контролем (без добавления пептида и ППКХ).

Добавление в культуру клеток SC5-MSC при репликативном старении пептида AED и ППКХ в дозах 200 нг/мл и 2000 нг/мл вызывало повышение экспрессии гена и синтеза коллагена II типа (рис. 13). Наиболее выраженный эффект оказывал ППКХ в концентрации 2000 нг/мл, повышая уровень мРНК *Coll2* в 3,1 раза и площадь экспрессии коллагена II типа в 3,8 раза по сравнению с контрольными культурами. ППКХ в концентрации 200 нг/мл оказывал менее выраженное влияние на эти показатели: уровень мРНК *Coll2* повышался в 2 раза, а площадь экспрессии – в 2,2 раза по сравнению с контролем. Пептид AED оказывал на экспрессию и синтез коллагена II типа в стареющих МСК человека одинаковое влияние в концентрациях 200 и 2000 нг/мл, повышая исследуемые показатели в среднем в 2,5 раза.

А



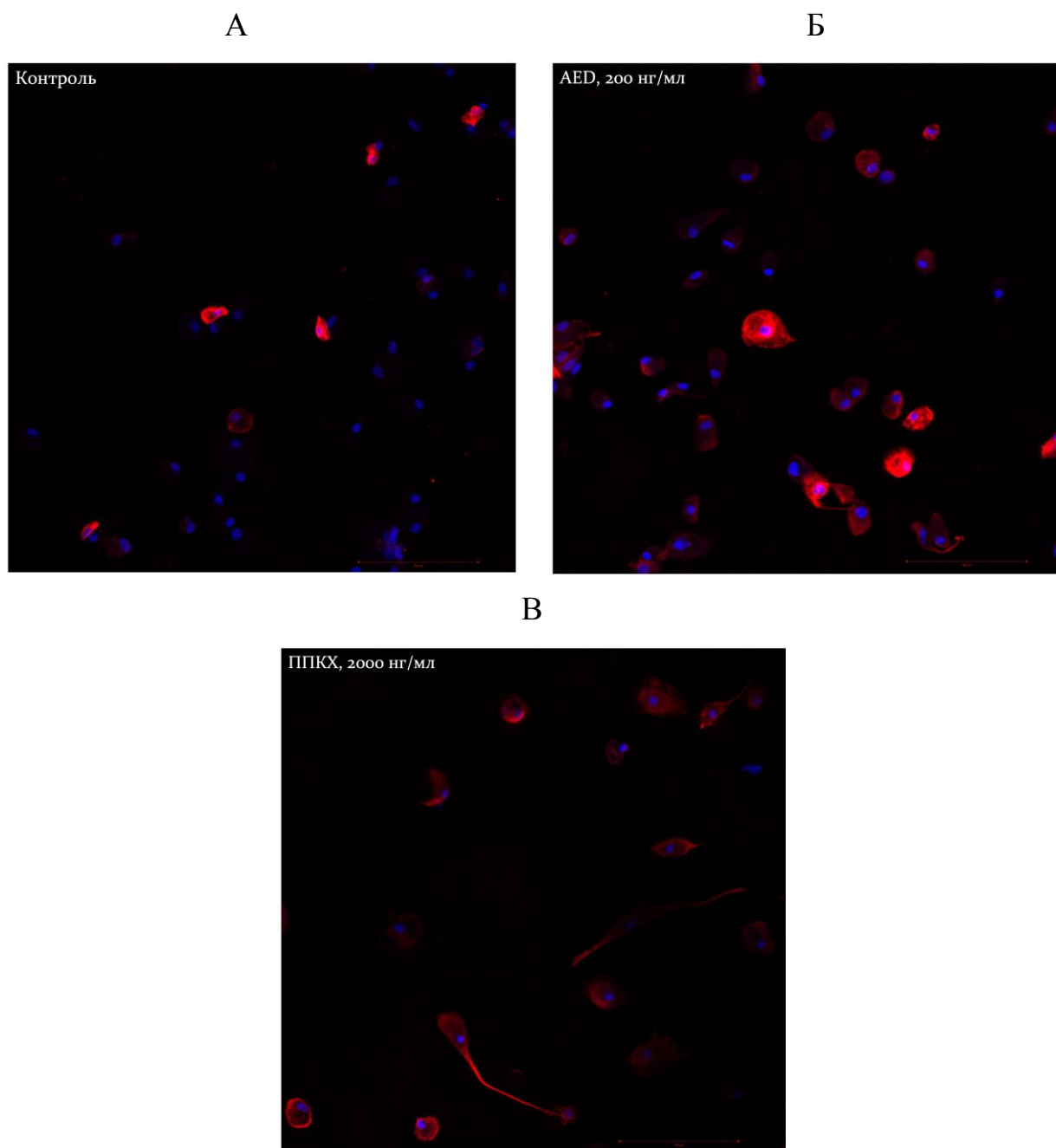
Б



**Рисунок 13.** Уровень мРНК (А) и площадь экспрессии (Б) коллагена II типа в МСК человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях. \*  $p < 0,01$  – по сравнению с контролем (без добавления пептида и ППКХ).

На рисунке 14 представлены результаты иммунофлуоресцентного окрашивания коллагена II типа в клетках SC5-MSC в контроле (А), при добавлении пептида AED в концентрации 200 нг/мл (Б) и при добавлении ППКХ в концентрации 2000 нг/мл (В). Иммуноокрашивание коллагена II типа

(красная флуоресценция) интенсивнее в культурах клеток с добавлением AED и ППКХ по сравнению с контрольными культурами.

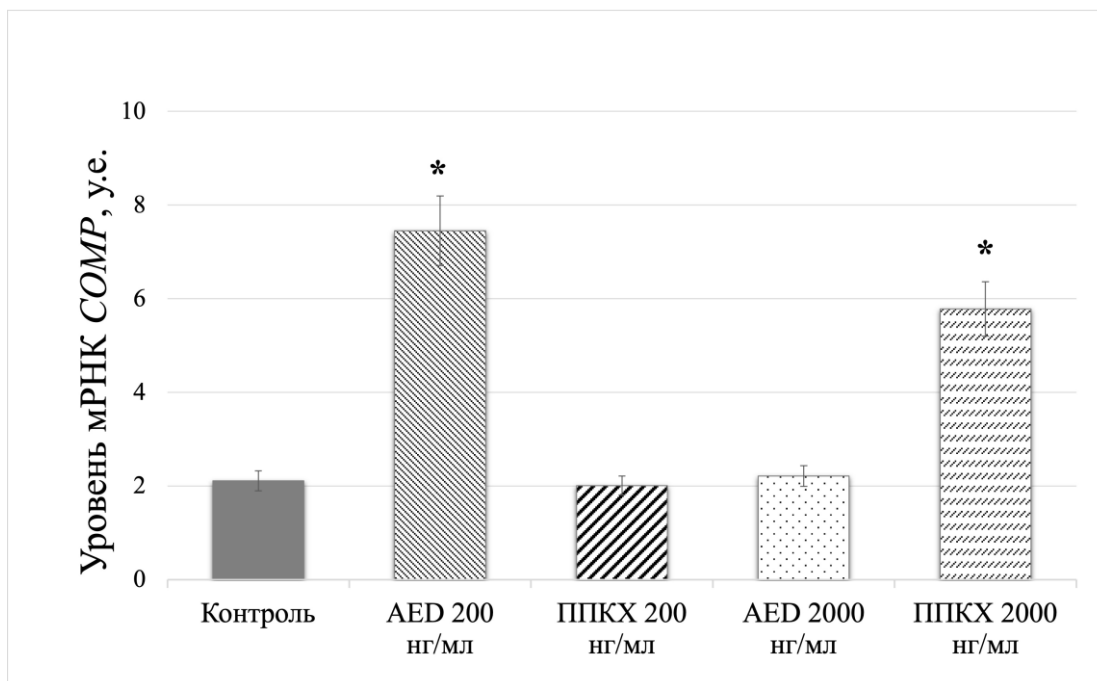


**Рисунок 14.** Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания клеток SC5-MSC антителами к коллагену II типа в контроле (А) и при добавлении пептида AED в концентрации 200 нг/мл (Б) и ППКХ в концентрации 2000 нг/мл (В).

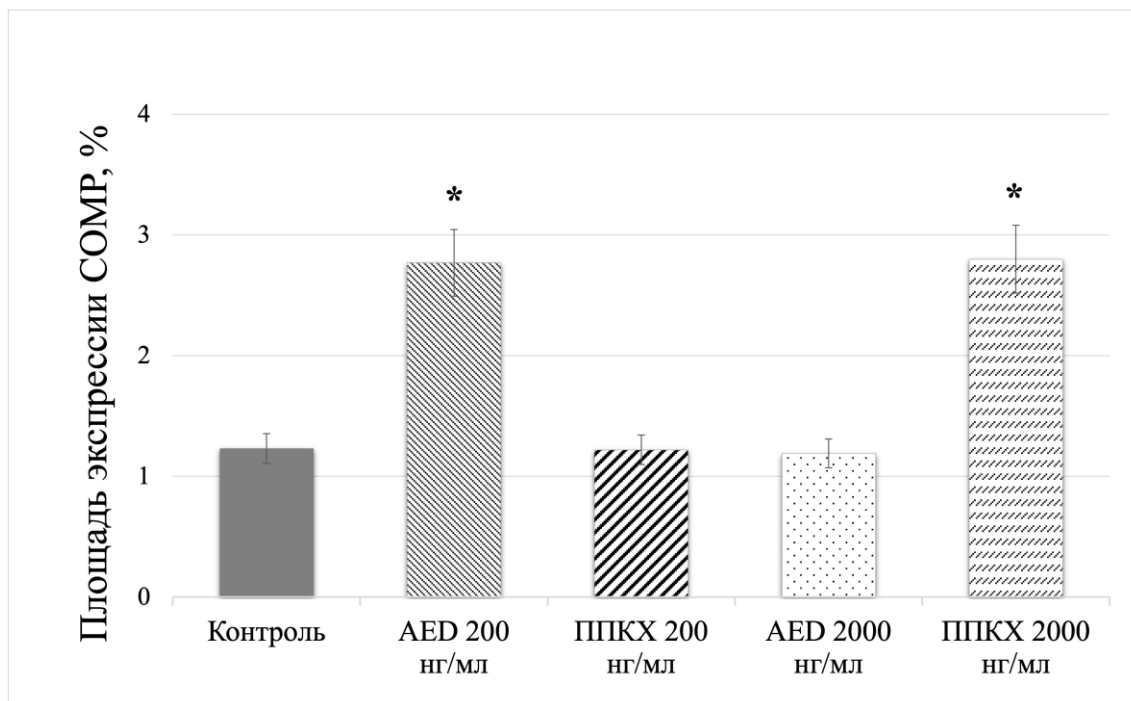
Определение уровней мРНК и площади экспрессии белка COMP в клетках SC5-MSC при репликативном старении и воздействии пептида AED и ППКХ показало, что паттерны экспрессии и синтеза в данном случае распределены практически также, как и в случае аггрекана. Однако в данном случае наиболее

выраженное действие на уровень мРНК *SOMP* при старении МСК оказывает пептид AED в концентрации 200 нг/мл, повышая этот показатель в 3,5 раза по сравнению с контролем (рис. 15А).

А



Б



**Рисунок 15.** Уровень мРНК (А) и площадь экспрессии (Б) *SOMP* в МСК человека при репликативном старении при воздействии пептидов в разных концентрациях. \*  $p < 0,01$  – по сравнению с контролем (без добавления пептида и ППКХ).

ППКХ в дозе 2000 нг/мл вызывает повышение уровня мРНК COMP в стареющих МСК в 2,7 раза по сравнению с контролем. При этом пептид AED в концентрации 2000 нг/мл и ППКХ в концентрации 200 нг/мл не оказывают влияния на экспрессию гена COMP в клетках SC5-MSC при репликативном старении (рис. 15А). Пептид AED в концентрации 200 нг/мл и ППКХ в концентрации 2000 нг/мл вызывали повышение площади экспрессии COMP в 2,3 раза при старении МСК по сравнению с контролем (рис. 15Б).

### **3.3. Влияние пептидов на формирование секреторного фенотипа хондроцитов, ассоциированного со старением**

Экспрессия p16 в культуре хондроцитов, полученных от старых животных была в 4,3 раза выше по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов молодых крыс (табл. 1). Пептид AED в концентрации 200 нг/мл снижал экспрессию проапоптотического белка p16 в 3 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 2,8 раза в культурах хондроцитов, полученных от старых животных. При добавлении ППКХ в культуру хондроцитов, выделенных у старых крыс, в концентрации 2000 нг/мл площадь экспрессии уменьшалась в 4,7 раза (табл. 1).

Экспрессия проапоптотического белка p21 в культуре хондроцитов, полученных от старых животных была в 4,5 раза выше по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов, выделенных у молодых крыс (табл. 1). Пептид AED снижал экспрессию p21 при добавлении в культуру старых хондроцитов в обеих концентрациях в 5,1-5,2 раза по сравнению с контролем. При добавлении ППКХ в культуру хондроцитов, выделенных у старых крыс, в концентрации 2000 нг/мл площадь экспрессии p21 уменьшалась в 4,1 раза по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов старых животных (табл. 1).

Экспрессия p53 в культуре хондроцитов, полученных от старых животных, была в 5 раз выше по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов от молодых животных (табл. 1). Пептид AED в концентрации 200



нг/мл снижал экспрессию проапоптотического белка p53 в 2,2 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 2,5 раза по сравнению с соответствующим контролем. ППКХ при добавлении в культуру хондроцитов, выделенных у старых крыс, в концентрации 200 нг/мл снижал экспрессию p53 в 1,6 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 3,9 раза по сравнению этим показателем в культурах хондроцитов старых крыс (табл. 1). Пептиды AED и ППКХ не влияли на экспрессию всех трех проапоптотических белков в культурах хондроцитов, полученных от молодых животных (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние пептидов на синтез проапоптотических белков в хондроцитах, полученных от молодых и старых животных**

Группа	Площадь экспрессии, %					
	p16		p21		p53	
	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных
Контроль	0,55±0,09	2,35±0,12#	0,48±0,06	2,18±0,19#	0,69±0,15	3,47±0,22#
AED, 200 нг/мл	0,47±0,11	0,78±0,13*	0,49±0,05	0,43±0,06*	0,53±0,10	1,17±0,06*
ППКХ, 200 нг/мл	0,50±0,10	2,01±0,11	0,55±0,08	1,99±0,08	0,66±0,14	2,23±0,14*
AED, 2000 нг/мл	0,52±0,11	0,85±0,11*	0,50±0,06	0,42±0,05*	0,50±0,10	1,25±0,09*
ППКХ, 2000 нг/мл	0,49±0,08	0,51±0,10*	0,39±0,09	0,53±0,07*	0,47±0,09	0,90±0,05*

# -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем в культурах хондроцитов молодых животных, \* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем в культурах хондроцитов старых животных.

При старении хондроцитов наблюдается снижение синтеза Sirt1 в 4,3 раза (табл. 2). При добавлении пептида AED в концентрации 200 нг/мл происходит увеличение экспрессии Sirt1 в 3,6 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 4,6 раза по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов, полученных от старых животных. При добавлении ППКХ в концентрации 200 нг/мл происходит увеличение экспрессии Sirt1 в культуре хондроцитов старых крыс в 3,3 раза, а в концентрации 2000 нг/мл - в 4,7 раза по сравнению с соответствующим контролем (табл. 2).

Экспрессия провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  была выше в 2,1 раза в культурах хондроцитов, полученных от старых животных по сравнению с этим показателем в культурах хондроцитов молодых животных (табл. 2). Только при добавлении ППКХ в культуру хондроцитов от старых животных в концентрации 2000 нг/мл происходило достоверное снижение площади экспрессии TNF $\alpha$  в 1,9 раз по сравнению с соответствующим контролем. При старении хондроцитов наблюдается увеличение синтеза IL-1 $\alpha$  в 3,8 раза (табл. 2). Снижение экспрессии IL-1 $\alpha$  в 1,6 и 1,9 раза в культурах хондроцитов старых животных наблюдалось при добавлении ППКХ в концентрациях 200 и 2000 нг/мл. Пептиды AED и ППКХ не влияют на синтез Sirt1 и провоспалительных цитокинов в хондроцитах, полученных от молодых животных (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние пептидов на синтез Sirt1 и провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  в хондроцитах, полученных от молодых и старых животных**

Группа	Площадь экспрессии, %					
	Sirt1		TNF $\alpha$		IL-1 $\alpha$	
	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных	Культуры хондроцитов от молодых животных	Культуры хондроцитов от старых животных
Контроль	4,78 $\pm$ 0,34	1,12 $\pm$ 0,06#	0,37 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,08#	0,44 $\pm$ 0,07	1,66 $\pm$ 0,12#
AED, 200 нг/мл	5,15 $\pm$ 0,30	4,02 $\pm$ 0,08*	0,39 $\pm$ 0,08	0,65 $\pm$ 0,11	0,40 $\pm$ 0,06	1,34 $\pm$ 0,18
ППКХ, 200 нг/мл	4,65 $\pm$ 0,27	3,66 $\pm$ 0,11*	0,32 $\pm$ 0,09	0,69 $\pm$ 0,12	0,36 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,10*
AED, 2000 нг/мл	5,04 $\pm$ 0,33	5,11 $\pm$ 0,15*	0,34 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,07	0,44 $\pm$ 0,08	1,40 $\pm$ 0,17
ППКХ, 2000 нг/мл	4,99 $\pm$ 0,29	5,31 $\pm$ 0,13*	0,38 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,06*	0,35 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,10*

# -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем в культурах хондроцитов молодых животных, \* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем в культурах хондроцитов старых животных.

Полученные данные согласуются с данными литературы: при старении возрастает синтез клетками проапоптотических белков, таких как p16, p21, p38, p53. Гиперэкспрессия p16 коррелирует с возрастом в хондроцитах суставов мыши и человека [Diekman B.O., Sessions G.A., Collins J.A., et al.,

2018]. Провоспалительные цитокины, такие как IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  способствуют формированию SASP и секретируются на ранних стадиях ОА [Ma C.H., Wu C.H., Jou I.M., et al., 2018; Min S., Wang C., Lu W., et al., 2017; Ni S., Miao K., Zhou X., et al., 2015]. Снижение синтеза Sirt1 в культурах хондроцитов при репликативном старении может свидетельствовать о снижении антиоксидантной защиты, что также способствует снижению синтеза коллагена и других компонентов ВКМ хряща, и формированию SASP.

### **3.5. Обсуждение**

Заболевания опорно-двигательного аппарата, включая ОА, являются одной из ведущих причин инвалидизации лиц среднего и пожилого возраста во всем мире. Как было описано в обзоре литературы, ОА представляет собой заболевание синовиальных суставов, которое характеризуется деградацией хряща и разрастанием кости в виде остеофитов и субхондрального утолщения. ОА постепенно прогрессирует, приводя к нарастанию болевого синдрома и потере подвижности. На молекулярно-клеточном уровне ОА характеризуется ускоренным старением хондроцитов и нарушением их функций. Нужно отметить, что для лечения ОА до сих пор не существует эффективной таргетной терапии. Поскольку ОА является ассоциированным с возрастом заболеванием, большое внимание уделяется поиску биологически активных веществ, обладающих не только хондропротекторными, но и геропротекторными свойствами [Jiang Y., 2022]. В связи с этим активно разрабатываются методы биоинженерии, способные стимулировать восстановление хрящевой ткани. К ним относится хондрогенная дифференцировка стволовых клеток, для стимуляции которой применяют различные биомолекулы, в том числе короткие пептиды и полипептидные комплексы.

Таковыми биорегуляторами являются полипептидный комплекс хрящевой ткани и трипептид AED. В клинических исследованиях I фазы был установлен безопасный профиль ППКХ у здоровых добровольцев. В настоящее время в рамках II фазы клинических испытаний проводится оценка его эффективности

и безопасности у больных гонартрозом второй и третьей степени [Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х., 2019]. Это свидетельствует о перспективности исследования ППКХ в качестве вещества, которое потенциально может быть эффективно при ОА и обладать геропротекторными свойствами. В состав ППКХ входят короткие пептиды с молекулярной массой от 75 до 846 Да, в том числе трипептид AED [Журкович И.К., Ковров Н.Г., Рыжак Г.А., и др., 2020].

Минимальной эффективной концентрацией пептида AED, стимулирующей пролиферацию хондроцитов молодых и старых крыс, является 200 нг/мл. В культурах хондроцитов, полученных от старых крыс, эффект пептида был более выражен, чем в клетках, полученных от молодых животных. Это указывает на сочетанное хондро- и геропротекторное действие трипептида и согласуется с результатами ранее проведенных исследований. Ранее в органотипических культурах тканей хряща молодых и старых крыс пептид AED увеличивал зону роста эксплантатов на 18-25%, что коррелировало с повышением синтеза пролиферотропного протеина PCNA и снижением экспрессии проапоптотического белка p53 [Смирнов А.В., Чалисова Н.И., Рыжак Г.А., и др., 2011].

Полученные данные показали, что минимальной эффективной концентрацией ППКХ, стимулирующей пролиферацию хондроцитов молодых и старых крыс, является 2000 нг/мл. В культурах хондроцитов, полученных от старых крыс, эффект пептида был более выражен, чем в клетках, полученных от молодых животных. Это свидетельствует о хондро- и геропротекторной активности ППКХ. Ранее было установлено, что ППКХ тканеспецифически стимулирует рост органотипической культуры ткани хряща молодых и старых крыс [Смирнов А.В., Чалисова Н.И., Рыжак Г.А., и др., 2011]. Этот полипептидный комплекс препятствовал развитию дегенеративно-дистрофических изменений в хрящевой ткани суставной поверхности в модели посттравматического остеоартроза в эксперименте [Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х., 2019].

Далее было установлено, что пептид AED и ППКХ в различных концентрациях стимулируют экспрессию генов и синтез белков-регуляторов хондрогенной дифференцировки МСК человека при репликативном старении: SOX9, агреканы, коллагена II типа и COMP. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл активирует экспрессию генов и синтез этих белков при старении хондроцитов *in vitro*, наиболее сильно влияя на коллаген II типа и COMP. ППКХ в концентрации 2000 нг/мл также оказывает выраженное стимулирующее влияние на экспрессию генов и синтез всех исследуемых белков в МСК человека при старении *in vitro*.

Известно, что ППКХ стимулирует пролиферацию и дифференцировку клеток соединительной ткани при старении, однако до сих пор не было проведено исследований по оценке молекулярных механизмов его геро- и хондропротекторного действия. Результаты данного исследования демонстрируют, что ППКХ имеет выраженный дозозависимый эффект: повышение его концентрации с 200 до 2000 нг/мл приводит к значительному увеличению экспрессии генов и экспрессии белков – факторов хондрогенеза. Интересно отметить, что даже в небольшой концентрации (200 нг/мл) ППКХ статистически значимо стимулирует экспрессию гена *Coll2* и синтез коллагена II типа. Поскольку снижение синтеза коллагена II типа является одним из основных признаков снижения функциональной активности хондроцитов при старении, эти данные указывают на геропротекторное действие ППКХ. Влияние ППКХ на все исследуемые молекулы, за исключением COMP, более выражено, чем действие пептида AED, что может быть объяснено наличием других пептидных молекул в составе полипептидного комплекса, которые также вносят вклад в стимуляцию дифференцировки МСК. Учитывая, что ППКХ в концентрации 2000 нг/мл повышает экспрессию генов и синтез всех исследуемых белков, можно предположить, что ППКХ оказывает влияние на хондрогенез как на уровне регуляции транскрипционных факторов (в частности, регулируя синтез Sox9), так и на уровне белков ВКМ. Вероятно, повышенный синтез Sox9 вызывает индукцию экспрессии генов и синтеза

белков агрекана, коллагена II типа и СОМР. Это, в свою очередь, может способствовать восстановлению пролиферации хондроцитов и хондрогенезу, нарушающимся при старении [Posey K.L., Coustry F., Necht J.T., 2018].

Влияние пептида АЕD на дифференцировку МСК имеет тенденцию, схожую с ППКХ. По-видимому, пептид АЕD индуцирует экспрессию гена *SOX9* и синтез белка *SOX9* в МСК человека при репликативном старении, что вызывает дальнейшую индукцию нижестоящих эффекторов хондрогенеза и белков ВКМ. При этом синтез агрекана и СОМР при репликативном старении МСК повышается только под действием трипептида в концентрации 200 нг/мл, а синтез коллагена II типа одинаково чувствителен как к концентрации пептида 200 нг/мл, так и 2000 нг/мл.

Клеточное старение хондроцитов включает в себя активацию апоптоза и формирование SASP [Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M., 2015]. SASP клеток хряща характеризуется секрецией сигнальных молекул, включая провоспалительные медиаторы и ферменты, разрушающие внеклеточный матрикс. SASP хондроцитов способствует развитию хронического системного воспаления. Воспаление, как известно, является одним из основных факторов риска развития возраст-ассоциированных заболеваний, включая ОА [Baker D.J., Wijshake T., Tchkonian T., et al., 2011]. Сенесцентные клетки накапливаются по мере старения организма, что приводит к снижению пролиферации и нарушению регенерации и функций тканей [He S., Sharpless N.E., 2017].

SASP характеризует функциональную активность и метаболизм клеток при старении [Wiley C.D., Campisi J., 2021] и может являться одной из причин развития ассоциированных с возрастом заболеваний, в частности, ОА. Изученные в диссертационном исследовании сигнальные молекулы, проапоптотические белки p16, p21, p53, провоспалительные цитокины  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\alpha$ , а также белок Sirt1, участвуют в формировании и регуляции SASP [Liu Y., Zhang Z., Li T., et al., 2022; Wu C.-J., Liu R.-X., Huan S.-W., et al., 2022]. При старении хондроцитов наблюдается увеличение продукции белков p16, p21,

p53, TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и снижение синтеза Sirt1. ППКХ и пептид AED способствовали нормализации синтеза указанных выше молекул при старении хондроцитов *in vitro*. Следует отметить, что наибольший геропротекторный эффект на синтез проапоптотических белков при формировании SASP хондроцитов оказывал пептид AED, а на продукцию провоспалительных цитокинов и Sirt1 - ППКХ. Эти данные способствуют пониманию молекулярных основ геро- и хондропротекторного действия ППКХ и пептид AED, описанных ранее при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, в частности дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов и позвоночника у людей старших возрастных групп [Повознюк В.В., Хавинсон В.Х., Макогончук А.В., и др., 2007].

**Заключение.** Таким образом, ППКХ и пептид AED обладают геро- и хондропротекторными свойствами в исследовании *in vitro*. ППКХ в концентрации 2000 нг/мл и пептид AED в концентрации 200 нг/мл стимулируют пролиферацию хондроцитов, полученных от молодых и старых животных. Эффективность обоих исследуемых пептидов выше при действии на клетки старых животных, что отражает их геропротекторное действие.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что ППКХ и пептид AED являются перспективными для дальнейшего изучения в качестве геропротекторных веществ, стимулирующих дифференцировку МСК человека при старении *in vitro* по хондрогенному пути. Этот геропротекторный эффект пептидов может быть важен с точки зрения поддержания пула функционально активных хондроцитов, снижение количества которых с возрастом является одним из факторов, приводящих к развитию ОА. Благодаря наличию множества коротких биологически активных пептидов, в том числе AED, ППКХ может рассматриваться как стимулятор репарации хрящевой ткани при ее старении и ассоциированных с возрастом заболеваниях, в том числе ОА. Поскольку снижение пролиферации хондроцитов является одним из клеточных механизмов развития ОА, полученные данные открывают перспективы для изучения

хондропротекторных свойств ППКХ и пептида AED на молекулярном уровне с целью разработки средств для терапии ОА.

SASP хондроцитов характеризуется повышением синтеза проапоптотических белков p16, p21, p53, провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и снижением продукции гистоновой деацетилазы Sirt1. Пептид AED снижает синтез проапоптотических факторов при старении хондроцитов. ППКХ уменьшает продукцию провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и стимулирует синтез Sirt1, снижение экспрессии которого характерно для сенесцентных клеток. Эти молекулярные аспекты пептидной геропротекции могут лежать в основе хондропротекторных свойств ППКХ и пептида AED и объяснять их эффективность при ОА у людей пожилого возраста.



## ВЫВОДЫ

1. Пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл в 2 раза повышают количество хондроцитов в культурах, полученных от молодых и старых крыс. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей оказывают более выраженное пролифератропное действие в культурах хондроцитов, полученных от старых животных.
2. Пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл стимулируют экспрессию мРНК транскрипционного фактора Sox9 и синтез белка SOX9 в мезенхимальных стволовых клетках человека. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл активируют экспрессию мРНК гена ACAN и синтез белка агрекана в МСК человека.
3. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрациях 200 и 2000 нг/мл повышают экспрессию мРНК и синтеза коллагена II типа в мезенхимальных стволовых клетках человека. Пептид AED в концентрации 200 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл стимулируют экспрессию мРНК гена *COMP* и синтез олигомерного матричного белка хряща в мезенхимальных стволовых клетках человека.
4. При старении в культурах хондроцитов выявлено повышение синтеза белков p16, p21, p53, TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и снижение синтеза Sirt1. Пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл снижают синтез белков p16, p21, p53 и повышают синтез Sirt1 в культурах хондроцитов при старении. Наибольшее влияние на провоспалительные цитокины оказывал полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл, снижая синтез TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  в хондроцитах, полученных от старых крыс.

5. Пептид AED в концентрациях 200 и 2000 нг/мл и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей в концентрации 2000 нг/мл стимулируют пролиферацию хондроцитов, полученных от старых животных. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей активируют экспрессию молекул SOX9, COMP, агрекана и коллагена II типа, участвующих в хондрогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток человека. Пептид AED и полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей снижают синтез проапоптотических белков p16, p21, p53 и повышают экспрессию Sirt1 при старении хондроцитов. Полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей снижает синтез провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  в хондроцитах при их старении.
6. Мишенями геропротекторного действия пептида AED и полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей являются проапоптотические протеины p16, p21, p53, сиртуин Sirt1 и маркеры хондрогенной дифференцировки SOX9, COMP, агрекан и коллаген II типа. Мишенями хондро-и геропотекторного действия полипептидного комплекса хрящевой и костной тканей также являются провоспалительные цитокины TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ .
7. Пептидная регуляция функций хондроцитов заключается в нормализации синтеза сигнальных молекул, формирующих их секреторный фенотип, и предотвращении образования фенотипа, ассоциированного с клеточным старением.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Выявленные противовоспалительные и геропотекторные свойства позволяют рекомендовать полипептидный комплекс хрящевой и костной тканей и пептид AED для экспериментального изучения в качестве средств профилактики болезней опорно-двигательного аппарата при старении организма.
2. Для углубленного понимания молекулярных основ геро- и хондропротекторного действия полипептидных комплексов хрящевой и костной тканей и пептида AED рекомендуется дальнейшее их изучение в наиболее эффективных концентрациях в моделях остеоартроза у животных с целью последующей разработки на их основе лекарственных препаратов для лечения и профилактики заболеваний опорно-двигательного аппарата, ассоциированных со старением.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Волк М.В., Лобанок Е.С., Волотовский П.А. Хондрогенный потенциал мезенхимных стволовых клеток // Известия национальной академии наук беларуси. Серия биологических наук. 2011. Т. 4. С. 113-120.
2. Гутоп Е.О., Линькова Н.С., Фридман Н.В. и др. Пептид AED активирует экспрессию генов и синтез белков дифференцировки фибробластов кожи человека при репликативном старении // Молекулярная медицина. - 2022. Т. 20 (2). С. 32–38.
3. Егоров И.В. Хондропротективная терапия остеоартрита: дань традиции или доказанная необходимость? // РМЖ. Медицинское обозрение. 2022. Т. 6(8). С. 480-485.
4. Журкович И.К., Ковров Н.Г., Рыжак Г.А., и др. Идентификация коротких пептидов в составе полипептидных комплексов, выделенных из органов животных // Успехи современной биологии. 2020. Т. 140(2). С. 140-148.
5. Повознюк В.В., Хавинсон В.Х., Макогончук А.В., и др. Изучение влияния пептидных регуляторов на структурно-функциональное состояние костной ткани крыс при старении // Успехи геронтологии. 2007. Т.20. №2. С. 134-137.
6. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. Выпуск 17. М.: РЛС-МЕДИА, 2009. 1296 с.
7. Рыжак Г.А., Попович И.Г., Хавинсон В.Х. Перспективы применения пептидного биорегулятора для профилактики и лечения возраст-ассоциированных заболеваний опорно-двигательного аппарата (обзор экспериментальных данных) // Патогенез. 2019. Т. 17(3). С. 13-24.
8. Сахенберг Е.И., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П. Исследование распластывания и организации актинового цитоскелета стромальных клеток костного мозга и клеток хряща при их отдельном и совместном культивировании на разных белках внеклеточного матрикса // Цитология. 2014. Т. 56(10). С. 708–716.

9. Смирнов А.В., Чалисова Н.И., Рыжак Г.А., и др. Геропротекторное действие аминокислот и трипептидов в культуре ткани хряща крыс // Успехи геронтологии. 2011. Т. 24(1). С. 139-142.
10. Хавинсон В.Х., Григорьев Е.И., Малинин В.В., Рыжак Г.А. Пептид, нормализующий метаболизм в костной и хрящевой тканях, фармацевтическая композиция на его основе и способ ее применения. Патент РФ № 2299741 от 30.05.2006.
11. Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Рыжак Г.А. Средство, нормализующее функции хрящевой ткани, и способ его получения. Патент РФ № 2302872 от 20.07.2007.
12. Хавинсон В.Х., Поворознюк В.В., Гапкалова И.В., Креслов Е.А., Макогончук А.В., Рыжак Г.Л. Изучение влияния пептидных регуляторов на структурно-функциональное состояние костной ткани крыс при старении // Успехи геронтологии. 2007. Т.20(2). С. 134-137.
13. Чалисова Н.И., Рыжак Г.А., Войцеховская М.А., Концевая Е.А., Смирнов А.В., Геропротекторное действие аминокислот и трипептидов в культуре ткани хряща крыс // Успехи геронтологии. 2011. Т. 24(1). С. 139-142.
14. Шукурова С.М., Хамроева З.Д., Почоджанова Ш.Ш., Шодиев Б.Р. Особенности клинического течения остеопороза у лиц пожилого и старческого возраста // Клиническая медицина. 2015. №4. С. 57-63.
15. Akkiraju H., Bonor J., Nohe A. СК2.1, a Novel Peptide, Induces Articular Cartilage Formation In Vivo // Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 2017. Vol. 35. P. 876–885.
16. Almeida M., O'Brien C.A. Basic biology of skeletal aging: role of stress response pathways // The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences. 2013. Vol. 68(10). P. 1197–1208.
17. Andersen T., Auk-Emblem P., Dornish M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels // Microarrays. 2015. Vol. 4. P. 133–161.
18. Arnold M.A., Kim Y., Czubryt M.P., Phan D., McAnally J., Qi X., Shelton J.M., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. MEF2C Transcription Factor

Controls Chondrocyte Hypertrophy and Bone Development // *Developmental Cell*. 2007. Vol. 12. P. 377–389.

19. Ashapkin V., Khavinson V., Shilovsky G. et al. Gene expression in human mesenchymal stem cell aging cultures: modulation by short peptides // *Molecular Biology Reports*. - 2020. Vol. 47(6). P. 4323-4329.

20. Ashraf S., Cha B.-H, Kim J.-S., Ahn J., Han I., Park H., Lee S.-H. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration // *Osteoarthritis Cartilage*. 2016. Vol. 24(2). P. 196-205.

21. Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T. et al. Clearance of P16Ink4a-Positive Senescent Cells Delays Ageing-Associated Disorders // *Nature*. 2011. Vol. 479. P. 232–236.

22. Basisty N., Kale A., Jeon O.H., Kuehnemann Ch., Payne T., Rao C., Holtz A., Shah S., Sharma V., Ferrucci L., Campisi J., Schilling B. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development // *PLoS Biology*. 2020. Vol. 18. P. e3000599.

23. Batshon G., Elayyan J., Qiq O., Reich E., Ben-Aderet L., Kandel L., Haze A., Stenmeyer J., Lefebvre V., Zhang H., Elisseeff J., Henrotin Y., Mobasheri A., Dvir-Ginzberg M. Serum NT/CT SIRT1 ratio reflects early osteoarthritis and chondrosenescence // *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2020. Vol. 79(10). P. 1370–1380.

24. Bernardo M.E., Emons J.A.M., Karperien M., Nauta A.J., Willemze R., Roelofs H., Romeo S., Marchini A., Rappold G.A., Vukicevic S. Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow Display a Better Chondrogenic Differentiation Compared with Other Sources // *Connective Tissue Research*. 2007. Vol. 48. P. 132–140.

25. Bhattaram P., Penzo-Méndez A., Kato K., Bandyopadhyay K., Gadi A., Taketo M.M., Lefebvre V. SOXC Proteins Amplify Canonical WNT Signaling to Secure Nonchondrocytic Fates in Skeletogenesis // *Journal of Cell Biology*. 2014. Vol. 207. P. 657–671.

26. Blaney Davidson E.N., van Caam A.P., van der Kraan P.M. Osteoarthritis year in review 2016: biology // *Osteoarthritis Cartilage*. 2017. Vol. 25(2). P. 175–180.
27. Boeuf S., Richter W. Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells: Role of Tissue Source and Inducing Factors // *Stem Cell Research & Therapy*. 2010. Vol. 1. P. 31.
28. Chen C., Zhou M., Ge Y., Wang X. SIRT1 and aging related signaling pathways // *Mech Ageing Dev*. 2020. Vol. 187. P. 111215.
29. Chen Q., Wu S., Wu Y., Chen L., Pang Q. miR-149 suppresses the inflammatory response of chondrocytes in osteoarthritis by down-regulating the activation of TAK1/NF- $\kappa$ B // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018. Vol. 101. P. 763–768.
30. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy // *Nat Med*. 2015. Vol. 21. № 12. P. 1424–1435.
31. Childs B.G., Gluscevic M., Baker D.J., Laberge R.-M., Marquess D., Dananberg J., van Deursen J. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017. Vol. 16. P. 718-735.
32. Chow Y.Y., Chin K.-Y. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis // *Mediators of Inflammation*. 2020. Vol. 2020. P. 8293921.
33. Coryell P.R., Brian O.D., Loeser R.F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis // *Nature Reviews Rheumatology*. 2021. Vol. 17(1). P. 47–57.
34. Del Rey M.J., Valin A., Usategui A., Ergueta S., Martin E., Municio C., Canete J., Blanco F., Criado G., Pablos J. Senescent synovial fibroblasts accumulate prematurely in rheumatoid arthritis tissues and display an enhanced inflammatory phenotype // *Immunity & Ageing*. 2019. Vol. 16. P. 29.
35. Diekman B.O., Sessions G.A., Collins J.A., Knecht A., Strum S., Mitin N., Carlson C., Loeser R., Sharpless N. Expression of p16INK 4a is a biomarker of

chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis // *Aging Cell*. 2018. Vol. 17. P. e12771.

36. Ding L., Hong X., Sun B., Huang Q., Wang X., Liu X., Li L., Huang Zh., Liu D. IL-37 is associated with osteoarthritis disease activity and suppresses proinflammatory cytokines production in synovial cells // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7(1). P. 11601.

37. Ding Y., Wang L., Zhao Q., Wu Zh., Kong L. MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway // *International Journal of Molecular Medicine*. 2019. Vol. 43(2). P. 779–790.

38. Dudek M., Gossan N., Yang N., Im H.-J., Ruckshanti J., Yoshitane H., Li X., Jin D., Wang P., Boudiffa M., Bellantuono I., Fukada Y., Boot-Handford R.P., Meng Q.-J. The chondrocyte clock gene *Bmal1* controls cartilage homeostasis and integrity // *Journal of Clinical Investigation*. 2016. Vol. 126(1). P. 365–376.

39. Dy P., Wang W., Bhattaram P., Wang Q., Wang L., Ballock R.T., Lefebvre V. Sox9 Directs Hypertrophic Maturation and Blocks Osteoblast Differentiation of Growth Plate Chondrocytes // *Developmental Cell*. 2012. Vol. 22. P. 597–609.

40. Favero M., Belluzzi E., Trisolino G. Goldring M., Goldring S.R., Cigolotti A., Pozzuoli A., Ruggieri P., Ramonda R., Grigolo B., Punzi L., Olivotto E. Inflammatory molecules produced by meniscus and synovium in early and end-stage osteoarthritis: a coculture study // *Journal of Cellular Physiology*. 2019. Vol. 234(7). P. 11176–11187.

41. Futrega K., Robey P.G., Klein T.J., Crawford R.W., Doran M.R. A Single Day of TGF-B1 Exposure Activates Chondrogenic and Hypertrophic Differentiation Pathways in Bone Marrow-Derived Stromal Cells // *Communications Biology*. 2021. Vol. 4. P. 1–12.

42. Greene M.A., Loeser R.F. Aging-related Inflammation in Osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage*. 2015. Vol. 23(11). P. 1966–1971.

43. Griffin M., Hindocha S., Khan W.S. Chondrogenic Differentiation of Adult MSCs // *Current Stem Cell Research and Therapy*. 2012. Vol. 7. P. 260–265.



44. Gui T., He B., Gan Q., Yang C. Enhanced SOCS3 in osteoarthritis may limit both proliferation and inflammation // *Biotechnic and Histochemistry*. 2017. Vol. 92(2). P. 107–114.
45. Gutop E.O., Linkova N.S., Kozhevnikova E.O., et al. AEDG Peptide Prevents Oxidative Stress in the Model of Induced Aging of Skin Fibroblasts // *Advances in Gerontology*. 2022. Vol. 12. N. 2. P. 143–148.
46. Hashimoto S., Nishiyama T., Hayashi S., Fujishiro T., Takebe K., Kanzaki N., Kuroda R., Kurosaka M. Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain // *Arthritis & Rheumatology Journal*. 2009. Vol. 60. P. 2340–2349.
47. He Q., Sun C., Lei W., Ma J. SOCS1 regulates apoptosis and inflammation by inhibiting IL-4 signaling in IL-1 $\beta$ -stimulated human osteoarthritic chondrocytes // *BioMed Research International*. 2017. Vol. 2017. P. 9.
48. He S., Sharpless N.E. Senescence in health and disease // *Cell*. 2017. Vol. 169. P. 1000–1011.
49. He Y., Wu Z., Xu L., Xu K., Chen Z., Ran J., Wu L. The role of SIRT3-mediated mitochondrial homeostasis in osteoarthritis // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020. Vol. 77(19). P. 3729–3743.
50. Henrotin Y., Mobasheri A., Marty M. Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis? // *Arthritis Research & Therapy*. 2012. Vol. 14. №1. P. 201.
51. Hermann W., Lambova S., Muller-Ladner U. Current Treatment Options for Osteoarthritis // *Current Rheumatology Reports*. 2018. Vol. 14. P. 108–116.
52. Hou S.M., Hou C.H., Liu J.F. CX3CL1 promotes MMP-3 production via the CX3CR1, c-Raf, MEK, ERK, and NF- $\kappa$ B signaling pathway in osteoarthritis synovial fibroblasts // *Arthritis Research and Therapy*. 2017. Vol. 19(1). P. 282.
53. Jeon O.H., David N., Campisi J., Elisseeff J.H. Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection // *Journal of Clinical Investigation*. 2018. Vol. 128(4). P. 1229–12371.

54. Jeon O.H., Kim C., Laberge R.-M., Demaria M., Rathod S., Vasserot A., Chung J., Kim D., Poon Y., David N., Baker D., van Deursen J., Campisi J., Elisseeff J. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment // *Nature Medicine*. 2017. Vol. 23. P. 775-781.
55. Jiang Y., Zhu L., Zhang T., Lu H., Wang C., Xue B., Xu X., Liu Y., Cai Zh., Sang W., Hua Y., Ma J. BRD4 has dual effects on the HMGB1 and NF- $\kappa$ B signalling pathways and is a potential therapeutic target for osteoarthritis // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2017. Vol. 1863(12). P. 3001–3015.
56. Jiang Y. Osteoarthritis year in review 2021: biology // *Osteoarthritis Cartilage*. 2022. Vol. 30(2). P. 207-215.
57. Khatri S., Hansen J., Pedersen N.B., et al. Cyclic Citrullinated Peptide Aptamer Treatment Attenuates Collagen-Induced Arthritis // *Biomacromolecules*. 2022. Vol. 23(5). P. 2126-2137.
58. Khavinson V.Kh., Grigoriev E.I., Malinin V.V. et al. Peptide normalizing osseous and cartilaginous tissue metabolism, pharmacological substance based thereon and method of its application. Eurasia Patent. EA 010574. 30.10.2008.
59. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Current Aging Science*. 2013. № 1 (6). P. 14–20.
60. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., et al. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: Choosing the correct model system // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2014. № 1 (69). P. 10–14.
61. Kim H.J. Park S.R. Park H.J., Choi B.H., Min B.-H. Potential predictive markers for proliferative capacity of cultured human articular chondrocytes: PCNA and p21 // *Artificial Organs*. 2005. Vol. 29(5). P. 393-398.
62. Kojima H., Inoue T., Kunimoto H., Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence // *JAKSTAT*. 2013 Vol. 2(4). P. e25763.
63. LeBlanc K.T., Walcott M.E., Gaur T., O’Connell S.L., Basil K., Tadiri C.P., Mason-Savas A., Silva J.A., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S., Ayers D.C.,

- Lian J.B., Fanning P.J. Runx1 Activities in Superficial Zone Chondrocytes, Osteoarthritic Chondrocyte Clones and Response to Mechanical Loading // *Journal of Cellular Physiology*. 2015. Vol. 230. P. 440–448.
64. Lee H.J., Yu C., Chansakul T., Hwang N.S., Varghese S., Yu S.M., Elisseeff J.H. Enhanced Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells in Collagen Mimetic Peptide-Mediated Microenvironment // *Tissue Engineering Part A*. 2008. Vol. 14. P. 1843–1851.
65. Legeai-Mallet L., Benoist-Lasselin C., Munnich A., Bonaventure J. Overexpression of FGFR3, Stat1, Stat5 and P21Cip1 Correlates with Phenotypic Severity and Defective Chondrocyte Differentiation in FGFR3-Related Chondrodysplasias // *Bone*. 2004. Vol. 34. P. 26–36.
66. Li H., Xie S., Qi Y., Li H., Zhang R., Lian Y. TNF- $\alpha$  increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018. Vol. 16(6). P. 4737–4744.
67. Li R., Xu J., Wong D.S.H., Li J., Zhao P., Bian L. Self-Assembled N-Cadherin Mimetic Peptide Hydrogels Promote the Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells through Inhibition of Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling // *Biomaterials*. 2017. Vol. 145. P. 33–43.
68. Lin X., Shanmugasundaram S., Liu Y., Derrien A., Nurminskaya M., Zamora P.O. B2A Peptide Induces Chondrogenic Differentiation In Vitro and Enhances Cartilage Repair in Rats // *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2012. Vol. 30. P. 1221–1228.
69. Liu C.-F., Lefebvre V. The Transcription Factors SOX9 and SOX5/SOX6 Cooperate Genome-Wide through Super-Enhancers to Drive Chondrogenesis // *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43. P. 8183–8203.
70. Liu C.-F., Samsa W.E., Zhou G., Lefebvre V. Transcriptional Control of Chondrocyte Specification and Differentiation // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2017. Vol. 62. P. 34–49.

71. Liu J., Xiao Q., Xiao J., Niu C., Li Y., Zhang X., Zhou Z., Shu G., Yin G. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling: Function, Biological Mechanisms, and Therapeutic Opportunities // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022. Vol. 7. P. 1–23.
72. Liu Y., Zhang Z., Li T., Xu H., Zhang H. Senescence in osteoarthritis: from mechanism to potential treatment // *Arthritis Research & Therapy*. 2022. Vol. 24(1). P. 174.
73. Ma B., Zhong L., van Blitterswijk C.A., Post J.N., Karperien M. T Cell Factor 4 Is a Pro-Catabolic and Apoptotic Factor in Human Articular Chondrocytes by Potentiating Nuclear Factor KB Signaling // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288. P. 17552–17558.
74. Ma C.H., Wu C.H., Jou I.M., Tu Y.-K., Hung C.-H., Hsiesh P.-L., Tsai K.-L. PKR activation causes inflammation and MMP-13 secretion in human degenerated articular chondrocytes // *Redox Biology*. 2018. Vol. 14. P. 72–81.
75. Ma L., Yang Z., Ding J., Liu S., Guo B., Yue Z. Function and Regulation of Transforming Growth Factor B1 Signalling in Antler Chondrocyte Proliferation and Differentiation // *Cell Proliferation*. 2019. Vol. 52. P. e12637.
76. Mahzoon S., Townsend J.M., Lam T.N., Sjoelund V., Detamore M.S. Effects of a Bioactive SPPEPS Peptide on Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells // *Annals of Biomedical Engineering*. 2019. Vol. 47. P. 2308–2321.
77. Mhanna R., Öztürk, E., Vallmajo-Martin Q., Millan C., Müller M., Zenobi-Wong M. GFOGER-Modified MMP-Sensitive Polyethylene Glycol Hydrogels Induce Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells // *Tissue Engineering. Part A*. 2014. Vol. 20. P. 1165.
78. Mikasa M., Rokutanda S., Komori H., Ito K., Tsang Y.S., Date Y., Yoshida C.A., Komori T. Regulation of Tcf7 by Runx2 in Chondrocyte Maturation and Proliferation // *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2011. Vol. 29. P. 291–299.
79. Min S., Wang C., Lu W., Xu Zh., Shi D., Chen D., Teng H., Jiang Q. Serum levels of the bone turnover markers dickkopf-1, osteoprotegerin, and TNF- $\alpha$  in knee osteoarthritis patients // *Clinical Rheumatology*. 2017. Vol. 36(10). P. 2351–2358.

80. Minguzzi M., Cetrullo S., D'Adamo S., Silvestri Y., Flamingi F., Borzi R.M. Emerging players at the intersection of chondrocyte loss of maturational arrest, oxidative stress, senescence and low-grade inflammation in osteoarthritis // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018. Vol. 2018. P. 3075293.
81. Monasterio G., Castillo F., Rojas L., Cafferata E., Alvarez C., Carvajal P., Nunez C., Flores G., Diaz W., Vernal R. Th1/Th17/Th22 immune response and their association with joint pain, immunological bone loss, RANKL expression and osteoclast activity in temporomandibular joint osteoarthritis: a preliminary report // *Journal of Oral Rehabilitation*. 2018. Vol. 45(8). P. 589–597.
82. Mushahary D., Spittler A., Kasper C., Weber V., Charwat V. Isolation, Cultivation, and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells // *Cytometry Part A*. 2018. Vol. 93. P. 19–31.
83. Ni S., Miao K., Zhou X., Xu N., Li C., Zhu R., Sun R., Wang Y. The involvement of follistatin-like protein 1 in osteoarthritis by elevating NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory cytokines and enhancing fibroblast like synoviocyte proliferation // *Arthritis Research and Therapy*. 2015. Vol. 17(1). P. 91.
84. Ogrodnik M., Salmonowicz H., Jurk D., Passos J.F. Expansion and cell-cycle arrest: common denominators of cellular senescence // *Trends in Biochemical Sciences*. 2019. Vol. 44. P. 996-1008.
85. Pearson M.J., Herndler-Brandstetter D., Tariq M.A., Nicholson T., Philp A., Smith H., Davis E., Jones S., Lord J. IL-6 secretion in osteoarthritis patients is mediated by chondrocyte-synovial fibroblast cross-talk and is enhanced by obesity // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7(1). P. 3451.
86. Peng H.Z., Yun Z., Wang W., Ma B.A. Dual specificity phosphatase 1 has a protective role in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes via inhibition of the MAPK signaling pathway // *Molecular Medicine Reports*. 2017. Vol. 16(6). P. 8441–8447.
87. Philipot D., Guerit D., Platano D., Chuchana P., Olivotto E., Espinoza F., Dorandeu A., Pers Y.-M., Piette J., Borzi R., Jorgensen C., Noel D., Brondello J.-M. p16INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal

- differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis // *Arthritis Research & Therapy*. 2014. Vol. 16(1). P. R58.
88. Posey K.L., Coustry F., Hecht J.T. Cartilage oligomeric matrix protein: COMPathies and beyond // *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2018. Vol. 71–72. P. 161–173.
89. Potthoff M.J., Olson E.N. MEF2: A Central Regulator of Diverse Developmental Programs // *Development*. 2007. Vol. 134. P. 4131–4140.
90. Qu R., Chen X., Wang W., Qui Ch., Ban M., Guo L., Vasilev K., Chen J., Li W., Zhao Y. Ghrelin protects against osteoarthritis through interplay with Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways // *FASEB Journal*. 2018. Vol. 32(2). P. 1044–1058.
91. Rakic R., Bourdon B., Demoor M., Maddens S., Saulnier N., Galéra P. Differences in the Intrinsic Chondrogenic Potential of Equine Umbilical Cord Matrix and Cord Blood Mesenchymal Stromal/Stem Cells for Cartilage Regeneration // *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8. P. 13799.
92. Re'em T., Tsur-Gang O., Cohen S. The Effect of Immobilized RGD Peptide in Macroporous Alginate Scaffolds on TGF-beta1-Induced Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31. P. 6746–6755.
93. Rodriguez-Merchan E.C. Regeneration of Articular Cartilage of the Knee // *International Journal of Clinical Rheumatology*. 2013. Vol. 33. P. 837–845.
94. Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? // *Frontiers in Physiology*. 2018. Vol. 9. P. 113.
95. Rosenzweig D.H., Ou S.J., Quinn T.M. P38 mitogen-activated protein kinase promotes dedifferentiation of primary articular chondrocytes in monolayer culture // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2013. Vol. 17(4). P. 508-517.
96. Scanzello C.R. Role of low-grade inflammation in osteoarthritis // *Current Opinion in Rheumatology*. 2017. Vol. 29(1). P. 79–85.
97. Schmidli M.R., Fuhrer B., Kurt N., Senn D., Drogemuller M., Rytz U., Spreng D., Forterre S. Inflammatory pattern of the infrapatellar fat pad in dogs with canine cruciate ligament disease // *BMC Veterinary Research*. 2018. Vol. 14(1). P. 161.

98. Shachpazyan N.R., Astrelina T.A., Yakovleva M.V. Mesenchymalstem Cells from Various Human Tissues: Biological Properties, Assessment of Quality and Safety for Clinical Use // *Genes&Cells*. 2012. Vol. 7. P. 23–33.
99. Shan Y., Qi C., Liu Y., Gao H., Zhao D., Jiang Y. Increased frequency of peripheral blood follicular helper T cells and elevated serum IL-21 levels in patients with knee osteoarthritis // *Molecular Medicine Reports*. 2017. Vol. 15(3). P. 1095–1102.
100. Sock E., Schmidt K., Hermanns-Borgmeyer I., Bösl M.R., Wegner M. Idiopathic Weight Reduction in Mice Deficient in the High-Mobility-Group Transcription Factor Sox8 // *Molecular and Cellular Biology*. 2001. Vol. 21. P. 6951–6959.
101. Somoza R.A., Welter J.F., Correa D., Caplan A.I. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations // *Tissue Engineering Part B Reviews*. 2014. Vol. 20. P. 596–608.
102. Sun J., Zheng Q. Experimental Study on Self-Assembly of KLD-12 Peptide Hydrogel and 3-D Culture of MSC Encapsulated within Hydrogel in Vitro // *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 2009. Vol. 29. P. 512–516.
103. Sun T., Li X., Song H., Gao F., Zhou G., Li Z., Chen Zh., Chen L. miR-146a aggravates LPS-induced inflammatory injury by targeting CXCR4 in the articular chondrocytes // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017. Vol. 44(4). P. 1282–1294.
104. Sun Y., Zhou L., Lv D., Liu H., He T., Wang X. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition prevents interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation in human osteoarthritic chondrocytes // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2015. Vol. 47(6). P. 422–430.
105. Takebe K., Nishiyama T., Hayashi S., Hashimoto S., Fujishiro T., Kanzaki N., Kawakita K., Iwasa K., Kuroda R., Kurosaka M. Regulation of p38 MAPK phosphorylation inhibits chondrocyte apoptosis in response to heat stress or mechanical stress // *International Journal of Molecular Medicine*. 2011. Vol. 27. P. 329-335.

106. Thomas N., Krishnapillai R., Bindhu P.R., Thomas P. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in oral squamous cell carcinoma // *Indian J. Dent. Res.* 2019. Vol. 30 (1). P. 102-106.
107. Tripathi J.K., Pal S., Awasthi B., Kumar A., Tandon A., Mitra K., Chattopadhyay N., Ghosh J.K. Variants of Self-Assembling Peptide, KLD-12 That Show Both Rapid Fracture Healing and Antimicrobial Properties // *Biomaterials.* 2015. Vol. 56. P. 92–103.
108. van Deursen J.M. The role of senescent cells in ageing // *Nature.* 2014. Vol. 509. P. 439-446.
109. Verrecchio A., Germann M.W., Schick B.P., Kung B., Twardowski T., San Antonio J.D. Design of Peptides with High Affinities for Heparin and Endothelial Cell Proteoglycans // *Journal of Biological Chemistry.* 2000. Vol. 275. P. 7701–7707.
110. Wang T., Wang Y., Liu L., Jiang Zh., Li X., Tong R., He J., Shi J. Research progress on sirtuins family members and cell senescence // *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2020. Vol. 193. P. 112207.
111. Wang Z., Weitzmann M.N., Sangadala S., Hutton W.C., Yoon S.T. Link Protein N-Terminal Peptide Binds to Bone Morphogenetic Protein (BMP) Type II Receptor and Drives Matrix Protein Expression in Rabbit Intervertebral Disc Cells // *Journal of Biological Chemistry.* 2013. Vol. 288. P. 28243–28253.
112. Wenhart C., Holthoff H.P., Reimann A., et al. A fructosylated peptide derived from a collagen II T cell epitope for long-term treatment of arthritis (FIA-CIA) in mice // *Scientific Reports.* 2021. Vol. 11(1). P. 17345.
113. Wiley C.D., Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention // *Nature Metabolism.* 2021. Vol. 3. P. 1290–1301.
114. Wu C.-J., Liu R.-X., Huan S.-W., et al. Senescent skeletal cells cross-talk with synovial cells plays a key role in the pathogenesis of osteoarthritis // *Arthritis Res Ther.* 2022. Vol. 24. P. 59.
115. Wu H., Whitfield T.W., Gordon J.A.R., Dobson J.R., Tai P.W.L., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S., Lian J.B. Genomic Occupancy of Runx2 with Global



Expression Profiling Identifies a Novel Dimension to Control of Osteoblastogenesis // *Genome Biology*. 2014. Vol. 15. P. R52.

116. Wu S., Morrison A., Sun H., De Luca F. Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) P65 Interacts with Stat5b in Growth Plate Chondrocytes and Mediates the Effects of Growth Hormone on Chondrogenesis and on the Expression of Insulin-like Growth Factor-1 and Bone Morphogenetic Protein-2 // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 286. P. 24726–24734.

117. Wu Y., Chen L., Wang Y., Li W., Lin Y., Yu D., Zhang L., Li F., Pan Z. Overexpression of Sirtuin 6 suppresses cellular senescence and NF- $\kappa$ B mediated inflammatory responses in osteoarthritis development // *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5. P. 17602.

118. Wu Y., Li Z., Jia W., Li M., Tang M. Upregulation of stanniocalcin-1 inhibits the development of osteoarthritis by inhibiting survival and inflammation of fibroblast-like synovial cells // *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019. Vol. 120(6). P. 9768–9780.

119. Xia J., Ni Z., Wang J., Zhu Sh., Ye H. Overexpression of lymphocyte activation gene-3 inhibits regulatory T cell responses in osteoarthritis // *DNA and Cell Biology*. 2017. Vol. 36(10). P. 862–869.

120. Xie L., Xie H., Chen C., Tao Z., Zhang C., Cai L. Inhibiting the PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signal pathway with nobiletin for attenuating the development of osteoarthritis: in vitro and in vivo // *Food & Function*. 2019. Vol. 10(4). P. 2161–2175.

121. Xu M., Bradley E.W., Weivoda M.M., Hwang S., Pirtskhalava T., Decklever T., Curran G., Ogrodnik M., Jurk D., Johnson K., Lowe V., Tchkonina T., Westendorf J., Kirkland J. Transplanted senescent cells induce an osteoarthritis-like condition in mice // *The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2017. Vol. 72. P. 780-785.

122. Yang Q., Ding W., Cao Y., Zhou Y., Ni Sh., Shi T., Fu W. Interferonregulatoryfactor-8(IRF-8) regulates the expression of matrix

- metalloproteinase-13 (MMP-13) in chondrocytes // *Cell Stress and Chaperones*. 2018. Vol. 23(3). P. 393–398.
123. Yang W., Kang X., Liu J., Li H., Ma Zh., Jin X., Qian Z., Xie T., Qin N., Feng D., Pan W., Chen Q., Sun H., Wu S. Clock gene *Bmal1* modulates human cartilage gene expression by crosstalk with *Sirt1* // *Endocrinology*. 2016. Vol. 157(8). P. 3096–3107.
124. Yi S.W., Kim H.J., Oh H.J., Shin H., Lee J.S., Park J.S., Park K.-H. Gene Expression Profiling of Chondrogenic Differentiation by Dexamethasone-Conjugated Polyethyleneimine with SOX Trio Genes in Stem Cells // *Stem Cell Research and Therapy*. 2018. Vol. 9. P. 341.
125. Young K., Morrison H. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ // *J. Vis. Exp.* 2018. Vol. 136. P. 57648.
126. Yu C.D., Miao W.H., Zhang Y.Y., Zou M.J., Yan X.F. Inhibition of miR-126 protects chondrocytes from IL-1 $\beta$  induced inflammation via upregulation of Bcl-2 // *Bone & Joint Research*. 2018. Vol. 7(6). P. 414–421.
127. Yu C.-Y., Huang W., Li, Z.-P., Lei, X.-Y., He D.-X., Sun, L. Progress in Self-Assembling Peptide-Based Nanomaterials for Biomedical Applications // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2016. Vol. 16. P. 281–290.
128. Yu D.-A., Han J., Kim B.-S. Stimulation of Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells // *International Journal of Stem Cells*. 2012. Vol. 5. P. 16–22.
129. Zeng R.M., Lu X.H., Lin J., Hu J., Rong Zh.-J., Xu W.-C., Liu Z.-W., Zeng W.-T. Knockdown of FOXM1 attenuates inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes // *International Immunopharmacology*. 2019. Vol. 68. P. 74–80.
130. Zeng R.M., Lu X.H., Lin J., Hu J., Rong Zh.-J., Xu W.-C., Liu Z.-W., Zeng W.-T. Knockdown of FOXM1 attenuates inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes // *International Immunopharmacology*. 2019. Vol. 68. P. 74–80.

131. Zha K., Sun Z., Yang Y., Chen M., Gao C., Fu L., Li H., Sui X., Guo Q., Liu S. Recent Developed Strategies for Enhancing Chondrogenic Differentiation of MSC: Impact on MSC-Based Therapy for Cartilage Regeneration // *Stem Cells International*. 2021. 8830834.
132. Zhang G., Sun Y., Wang Y., Liu R., Bao Y., Li Q. miR-502-5p inhibits IL-1 $\beta$ -induced chondrocyte injury by targeting TRAF2 // *Cellular Immunology*. 2016. Vol. 302. P. 50–57.
133. Zhang X.X., He S.H., Liang X., Li W., Li T.-F., Li D.-F. Aging, Cell Senescence, the Pathogenesis and Targeted Therapies of Osteoarthritis // *Frontiers in Pharmacology*. 2021. Vol. 12. P. 728100.
134. Zhang Y., Unnikrishnan A., Deepa S.S., Liu Y., Li Y., Ikeno Y., Sosnowska D., Van Remmen H., Richardson A. A new role for oxidative stress in aging: the accelerated aging phenotype in Sod1(-/-) mice is correlated to increased cellular senescence // *Redox Biology*. 2017. Vol. 11. P. 30–37.
135. Zhernasechanka H.A., Isaikina Y.I., Filipovich T.V., Liakh E.G. Osteogenic and chondrogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells obtained from the bone marrow and placenta // *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*. 2021. Vol. 18. P. 36–45.