



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“



Благовеста Димитрова Тодорова

**Противовъзпалително действие на екстракт от *Crocus sativus* и
астаксантин при миши модел на колагеназа-индуциран
остеоартрит**

ДИСЕРТАЦИЯ

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Направление „Биологически науки“ 4.3., докторска програма „Имунология“

Научни ръководители:

професор д-р Андрей Иванов Чорбанов

доцент д-р Николина Михайлова Михайлова

София 2025 година

Настоящата дисертация е разработена в Департамент по имунология, Лаборатория по експериментална имунология, Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН с финансиране по научен проект № КП-06-НЗЗ/8 от фонд „Научни изследвания“ – МОН.

Дисертационният труд съдържа 143 страници и е илюстриран с 70 фигури. Библиографската справка включва 243 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Национания семинар по „Имунология“ на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на ____ . ____ . ____ год. от ____ : ____ часа в залата на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София. Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, София, както и са публикувани съгласно ЗРАСРБ на адрес www.microbio.bas.bg

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по Микробиология „Стефан Ангелов“

Благовеста Димитрова Тодорова

**Противовъзпалително действие на екстракт от *Crocus sativus* и астаксантин
при миши модел на колагеназа-индуциран остеоартрит**

АВТОРЕФЕРАТ

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Направление „Биологически науки“4.3., докторска програма „Имунология“

Научни ръководители:

професор д-р Андрей Иванов Чорбанов

доцент д-р Николина Михайлова Михайлова

Научно жури:

доц. д-р Анастас Пашов

проф. д-р Доброслав Кюркчиев

проф. д-р Севделина Ламбова

проф. д-р Сорен Хайрабедян

проф. д-р Румен Стоилов

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

AMs – Adhesive molecules (адхезионни молекули);

ADAMTS – a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (дезинтегрин и металопротеиназа с тромбоспондинови мотиви);

AMPK – activated protein kinase (активирана протеинова киназа);

AST(A) – astaxanthin (астаксантин);

BMP – Bone morphogenetic protein (костни морфогенни протеини);

CD – Cluster of differentiation (клъстер на диференциация);

CIOA – Collagenase-induced osteoarthritis (колагеназа-индуциран остеоартрит);

CRP – C- reactive protein (С-реактивен протеин);

COX – cyclooxygenase (циклооксигеназа);

DAMPs – Damage-associated molecular patterns (Опасност-асоциирани молекулни мотиви);

DMSO – Dimethyl sulfoxide (диметил сулфоксид);

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Етилендиаминтетраоцетна киселина);

ERK – Extracellular signal-regulated kinases (извънклетъчна сигнало- регулираща киназа);

FACS – Fluorescence-activated cell sorting (проточен цитрометър);

FCS – Fetal calf serum (фетален телешки серум);

FR β – Folate Receptor β (Фолатов рецептор β);

GAGs – глюкозаминогликани;

GSH – Glutathione (глутатион);

HGF – Hepatocyte growth factor (фактор на хепатоцитния растеж);

ICAM – Intercellular Adhesion Molecule (Междуклетъчна адхезионна молекула);

IFN – γ - Interferon-Gamma (интерферон-гама);

IFP – Infrapatellar fat pad (интрапателарна мастна подложка);

IKK – I κ B kinase (ензимен комплекс, част от NF- κ B сигналния път);

IL – Interleukin (интерлевкин);

iNOS – Inducible nitric oxide synthase (индуцируем азотен синтез);

LD 50 – летална доза на 50% от тестовите обекти;

LDL – Low Density Lipoproteins – Cholesterol (липопротеини с ниска плътност- холестерол);

LPS – Lipopolysaccharide (липополизахарид);

MAPK – Mitogen-activated protein kinase (митоген-активираща протеинова киназа);

MCP – Monocyte chemoattractant protein (Моноцитен хемопривличащ протеин);

MIA – Mono-iodoacetate (монойодацетат);

MMPs – Matrix metalloproteinases (матриксни металопротеинази);

MTT – 3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (3- (4, 5-диметилтиазол-2-ил) -2, 5-дифенилтетразолиев бромид);

NF- κ B – Nuclear factor kappa enhancer of activated B cells (ядрен фактор капа усилващ активирани В клетки);

Nrf-2 – The Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Ядрен фактор еритроиден 2-свързан фактор 2);

NSAIDs – Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (нестероидни противовъзпалителни лекарства);

OA – Osteoarthritis (Остеоартрит);

P-, E-selectin – P-, E селектин,

PBS – Phosphate-buffered saline (фосфатно-буфериран физиологичен разтвор);

Per os – перорално;

PG – Prostacyclin (простагландин);

RA – ревматоиден артрит (РА);

RANKL – Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (рецепторен активатор на ядрения фактор капа - В лиганд);

RNS – Reactive nitrogen species (реактивни азотни молекули);

ROS – Reactive oxygen species (реактивни кислородни радикали);

RS – Reactive species (реактивни молекули);

TCR – Т-клетъчен рецептор;

TGF- β – Transforming growth factor beta (трансформиращ растежен фактор бета);

TLR – Toll-like receptor (тол лайк рецептор);

Th – Т помощни клетки;

TNF- α – Tumor necrosis factor alpha (Тумор некротизиращ фактор алфа);

VCAM – Vascular cell adhesion protein (Протеин за адхезия на съдови клетки);

α 1m – α 1-microglobulin (α 1 микроглобулин);

α 2m – α 2-microglobulin (α 2 микроглобулин).

I. Увод

Остеоартритът (ОА) е едно от най-широко разпространените възрастово-обусловени хронични дегенеративни заболявания. Развитието на заболяването прогресира бавно и се проявява с болка, намаляване на подвижността, ремоделиране на засегнатата става и в следствие води до трайна инвалидизация. Диагностиката му е затруднена, което силно ограничава ранното му лечение. Терапевтичните средства, които се прилагат са болкоуспокояващи и противовъзпалителни лекарства, насочени към повлияване на симптоматиката.

Нарушаването на хомеостазата в засегнатата става предизвиква активиране на механизми за справяне с измененията и възстановяване на нормалното състояние. Среда за всички тези процеси е синовиалната течност и синовиалната мембрана, където се освобождават цитокини, хемокини, неuropeптиди, липидни възпалителни медиатори, увеличат се клетки на вродената и адаптивната имунна система и се проявява патогенезата на ОА. Взаимоотношенията и ефектите на тези механизми са отправна точка при изследване на болестта.

Повлияването на вече доказаните фактори, участващи в развитието на заболяването са обект на нови терапевтични подходи, фокусирани върху различни природни субстанции и екстракти. В целевата група попада екстракта от *Crocus sativus* и каротеноида астаксантин поради доказаните си антиоксидантни, противовъзпалителни и модулиращи свойства. Благотворните свойства на екстракта от шафран се проучват в множество изследвания за повлияване на различни заболявания обвързани със стареенето, нервната и кръвоносната системи, автоимунитета, намаляване на оксидативния стрес и свободните радикали. Модулиращите свойства на екстракта от астаксантин повлияват клетъчните популации и процесите на ремоделиране на ставата.

Беше използван индуциран миши модел на остеоартрит (CIOA) чрез колагеназа, предизвикваща симптоми на локално възпаление и в следствие хистопатологични изменения, характерни за ОА. Върху разработения миши модел на остеоартрит проучихме ефекта на изследваните субстанции в хода на развитието на заболяването и прогресивните изменения в ставите.

Проследихме измененията в хистопатологичните показатели, анализирахме *ex vivo* клетъчните популации в слезката, локално в синовиалната течност и костното вещество. Приложихме *in vitro* стимулации с различни концентрации на екстракт от шафран и астаксантин. Отчетен беше ефектът на приложените природни продукти върху макрофаговите субпопулации, пролиферативната активност, клетъчната смърт и нивата на ключови цитокини, повлияващи активацията на основни сигнални пътища.

Бяха приложени няколко различни концентрации от тествания екстракт от *Crocus sativus* върху експерименталните животни и беше отчетен положителен ефект чрез потискане на костната деструкция, моделиране на възпалителния процес и запазване на целостта на ставните хрущяли.

При проследяване на повлияването на заболяването след прилагане на астаксантин в концентрация 15 mg/kg беше отчетено повишаване на степента на костно ремоделиране. При групите третирани с каротеноида, деструкцията на хрущяла беше потисната и беше отчетена засилена диференциация на остеобластите.

В заключение, екстрактът от *Crocus sativus* и в по-малка степен природният продукт астаксантин имат терапевтичен потенциал при миши експериментален модел на ОА.

II. Изложение

1. Цели и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е да се анализира терапевтичния потенциал на екстракт от *Crocus sativus* и *Астаксантин* върху експериментален миши модел на колагеназа-индуциран остеоартрит, като се проследят имунологични показатели, увреждането на тъканите и повлияване на симптоматиката в хода на заболяването.

За осъществяването на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Комплексен имунологичен анализ на етапите на развитие на ОА при експериментален миши модел.
2. Анализ на въздействието на терапия с екстракта от *Crocus sativus* върху експерименталния модел;
3. Анализ на въздействието на терапия с *Астаксантин* върху миши модел на ОА.

2. Материали и методи

2.1. Експериментални животни

За експериментите бяха използвани женски и мъжки животни от имбредна миша линия Balb/c на възраст 8-10 седмици.

2.2. Колагеназа

За индуциране на артритното заболяване беше използвана колагеназа тип AI (Collagenase тип AI от *Clostridium histolyticum*, Sigma, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, # C9891) от *Clostridium histolyticum*. Беше приготвен разтвор на колагеназа тип AI в работна концентрация 2 mg/ml в TRIS-HCl буфер с pH 7.0 (0.005 M Tris-hydrochloride, 0.005 M CaCl₂).

2.3. Екстракт от *Crocus sativus*

При експериментите беше използван алкохолен екстракт от *Crocus sativus*, любезно предоставено от проф. Улдуз Хашимова от Институт по физиология на Азербайджанската национална академия на науките. За приготвянето на екстракта са използвани шафранови близалца (*Crocus sativus* L.), отглеждани в село Билгя на полуостров Абшерон, Азербайджан.

2.4. Астаксантин

Беше използвано сухо вещество от Астаксантин, добит от *Blakeslea trispora* (Sigma # SML0982). Каротеноидът беше разтворен в студено пресован зехтин (Costa d'Oro). За *in vitro* експериментите беше използван синтетично добит Астаксантин (Acros organics Lot # A0389259).

2.5. Антитела

За фенотипизиране на клетъчни суспензии от спленоцити, костен мозък и синовиум чрез флоуцитометричен анализ бяха използвани следните белязани с флуорохроми антитела: Phycoerythrin (PE)-конюгирано анти-мише CD19 антитяло (Cat# 115508, клон 6D5, BioLegend), анти-мише CD69 антитяло (Cat# 104508, клон H1.2F3, BioLegend), анти-мише CD107a (LAMP-1) антитяло (Cat# 121612, клон 1D4B, BioLegend) и анти-мише F4/80 антитяло (Cat# 123110, клон BM8, BioLegend); eFlour450 конюгирано анти-мише CD3-антитяло (Cat# 48-0037-42, клон ОКТ3, eBioscience); Allophycocyanin (APC)-конюгирано анти-мише CD4 антитяло (Cat# 17-0041-82, клон GK1.5, eBioscience), анти-мише CD14 антитяло (Cat# 123312, клон Sa14-2, BioLegend), анти-мише CD11b антитяло (Cat# 101210, клон M1/70, BioLegend) и анти-мише CD25 антитяло (Cat# 102012, клон PC61, BioLegend); Fluorescein isothiocyanate (FITC)-конюгирани анти-мише CD4 антитяло (Cat# 100405, клон GK1.5, BioLegend), анти-мише CD8 антитяло (Cat# 11-0083-82, клон eBioH35-17.2, eBioscience), анти-мише CD335 антитяло

(Cat#137606, клон 29A1.4, BioLegend) и анти-мише Ly6G антитяло (Cat# 11-5931-82, клон RB6-8C5, eBioscience).

2.6. Миши модели на колагеназа-индуциран остеоартрит и сформирание на експериментални терапевтични групи

Balb/c мишките бяха анестезирани, областта на колянната става беше почистена с 70% етанол и с помощта на спринцовка тип Hamilton бяха инжектирани по 10 μ l разтвор на колагеназа тип I A в двете коленни стави на животните. След манипулацията бяха проведени мероприятията по извеждане на животните от анестезия.

За тестване ефекта на екстракт от *Crocus sativus* върху развитието на остеоартрит, животните бяха разпределени на случаен принцип в 4 експериментални групи от по 5 животни, съответно 3 групи бяха третирани с различни концентрации на екстракта от *Crocus sativus* - 100 mg/kg (Група 2), 50 mg/kg (Група 3), 25 mg/kg (Група 4) и група животни с индуциран остеоартрит (Група 1), които бяха третирани с PBS. Две други групи от по 5 животни бяха използвани като контролни, съответно – здрави животни, третирани с най-високата концентрация от екстракта и здрави, които бяха третирани с PBS.

За тестване ефекта на Астаксантин върху развитието на остеоартрит, животните бяха разпределени на случаен принцип в 4 експериментални групи от по 5 животни - една група животни с индуциран остеоартрит, които бяха третирани с PBS; една група животни с индуциран остеоартрит, които бяха третирани с Астаксантин с концентрация 15 mg/kg/bw, както и две контролни групи, съответно – здрави животни, третирани с Астаксантин (15 mg/kg/bw) и здрави животни третирани със зехтин.

2.7. Схема на приложение на екстрактите от *Crocus sativus* и Астаксантин

2.7.1. Орален прием на екстракта от *Crocus sativus*

Ден след индуциране на модела стартира терапията с екстракт от *Crocus sativus* чрез ежедневно хранване с 300 μ l екстракт в съответната концентрация или с PBS в продължение на 30 дни. Третирането беше извършвано per os (p. o.) с помощта на метална игла за хранене с обезопасен връх. Иглата беше вкарвана много внимателно през устата в хранопровода на животните до отвора на стомаха, където беше въвеждано цялото количество от екстракта в съответната концентрация.

Всекидневно бяха приготвяни свежи разтвори. От разтвор с концентрация 1 g/100 ml бяха приготвени работните разтвори от *Crocus sativus* за различните групи експериментални животни.

2.7.2. Орален прием на екстракт от Астаксантин

Ден след индуциране на модела беше стартирана терапията на животните с Астаксантин в концентрация 15 mg/kg/bw. Ежедневно животните бяха захранвани с по 190 µl екстракт по същия способ, както при експериментите с екстракта от *Crocus sativus*, за да се гарантира доставяне на конкретно количеството активно вещество.

Ежедневно, преди третирането беше претегляно и разтваряно в обем зехтин необходимото количество астаксантин чрез хомогенизиране чрез вортексиране.

Контролните групи животни бяха третирани по сходен начин съответно с буфериран физиологичен разтвор.

2.8. Изолване на спленоцити

Слезки от експерименталните животни бяха отпрепарирани и стрити през клетъчна мрежичка (70 µm) в среда за култивиране RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium; Gibco, Gaithersburg, MD), съдържаща 10% FCS (фетален телешки серум), 4 Mm L-глутамин, 50 Mm 2-меркаптоетанол и антибиотици). Клетъчната суспензия беше центрофугирана за 10 минути при 1300 rpm/4 °C. Супернатантата беше отстранена и клетките бяха ресуспендирани в лизиращ еритроцитите буфер (0.155 M NH₄Cl, 0.01M KHCO₃, 0.13 mM EDTA, pH 7.0-7.2). Процесът на лизиране беше спрял чрез добавяне на студена среда или PBS. След промиване на клетките чрез центрофугиране за 10 минути при 1300 rpm/4 °C, последните бяха преброени в камера на Бюркер. Необходимото количество клетки бяха ресуспендирани във FACS буфер (PBS; 2.5% FCS; 0.05% NaN₃) за последващ анализ на проточен цитрометър или в среда за култивиране.

2.9. Изолване на перитонеални макрофаги

За изолване на перитонеални макрофаги експерименталните животни бяха жертвани чрез прекъсване на гръбначния мозък. Много внимателно беше отстранена кожата от коремната област и беше въведена в коремната кухина 10 ml RPMI без FCS за промиване на перитонеумът. Течността беше събрана, центрофугирана за 10 мин. при 1300 rpm/4 °C и утаените клетки бяха лизирани (ако се налага), ресуспендирани и преброени в камера на Бюркер.

2.10. Изолиране на синовиални клетки

След жертване на експерименталните животни внимателно беше отделена кожата от задните им крайници, които бяха отделени от тазобедрената става. След внимателно почистване на мускулатурата бяха отпрепарирани колянните стави. Костите бяха промити с PBS, за да се предотврати замърсяване на пробата с костно-мозъчни клетки. Изолирането на синовиалните клетки беше извършено чрез инкубиране на колянна става в разтвор на колагеназа тип IA в концентрация 2 mg/ml разтворена в пълна DMEM среда (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) съдържаща 10% FCS, 4 mM L-глутамин, 50 mM 2-меркаптоетанол и антибиотици) за 1 час при 37 °C и интензивно разклащане. След края на инкубацията, костите бяха интензивно вортексириани в течността. След отделяне на костите, синовиалните изолати бяха центрофугирани за 10 минути при 1100 rpm на стайна температура. Супернатантата беше отстранена и клетките бяха ресуспендирани в лизиращ еритроцитите буфер. Процесът на лизиране беше спрял чрез добавяне на среда или PBS. След преминаване на клетъчната суспензия през клетъчна мрежичка (70 µm), клетките бяха центрофугирани за 10 минути при 1300 rpm и преброени в камера на Бюркер. Необходимото количество клетки бяха ресуспендирани във FACS буфер за последващ анализ на проточен цитрометър, а останалите клетки бяха замразени за последващ анализ.

2.11. Изолиране на костно-мозъчни стромални клетки

След жертване на опитните животни тазобедрената кост и тибията бяха отпрепарирани, като цялостта на костите беше запазена и бяха поставени в петри с PBS. Костите бяха промити чрез спринцовка с PBS и игла G-24 до цялостното отделяне на костно-мозъчното вещество. След ресуспендиране клетките бяха филтрирани през клетъчна мрежичка (70 µm) и центрофугирани при стандартни условия. След лизиране на еритроцитите и последващо промиване, получените клетки бяха преброени.

2.12. МТТ тест за пролиферация на спленоцити

В 96 ямкова плака за клетъчно култивиране бяха нанесени по 100 µl (1×10^6 клетки/ml) спленоцити на ямка. Част от клетките бяха инкубирани в присъствието на различни концентрации от тествания екстракт от *Crocus sativus* (5 mg/ml; 1 mg/ml; 0.5 mg/ml; 0.25 mg/ml и 0.1 mg/ml) и Астаксантин (за положителни контроли бяха използвани клетки, стимулирани с LPS (5 mg/ml) и/или конканавалин А (Con A) (10 mg/ml)). Клетките бяха инкубирани при 37 °C и 5% CO₂ за различни часови интервали - 24, 48 и 72 часа. Четири часа преди края на инкубацията беше добавено тетразолното багрило МТТ (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-

diphenyltetrazolium bromide) в концентрация 5 mg/ml по 20 µl/ямка. В края на инкубирането, чрез добавяне на DMSO като солвент на багрилото беше отчетена концентрацията на формазан, натрупана вътре в клетката и върху клетъчната повърхност. Беше измерена абсорбцията на цветната реакция при дължина на вълната от 595 nm на ELISA reader Labsystems Multiskan EX.

2.13. Диференциация на костно мозъчни прекурсори до многоядрени клетки, морфологично подобни на остеокласти

Изолираните костно-мозъчни клетки (в концентрация 1×10^5) бяха преброени и разпределени по схема в 24 или 48 ямкови плаки за клетъчно култивиране. Към съответните ямки бяха добавени различни концентрации (4 µg/ml; 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0, 5 µg/ml; 0, 5 µg/ml; 0, 125 µg/ml) от изследваните екстракти, като най-високите концентрации бяха значително по-ниски от токсичните такива. Част от клетките бяха инкубирани с допълнителен стимул витамин Д (1, 25 Dihydroxyvitamin D3 (1, 25(OH)₂D₃)), който предизвиква експресия на RANKL и диференциация на остеокласти [184]. Клетките бяха култивирани в продължение на 7 дни в среда за култивиране RPMI, съдържаща 10% FCS, 4 Mm L-глутамин, 50 Mm 2-меркаптоетанол и антибиотици. Разтварянето на екстракта от *Crocus Sativus* беше в среда, докато Астаксантина беше разтварян в DMSO. Средата и стимулите бяха сменяни на всеки три дни. След седмия ден клетките бяха оцветявани с кристал виолет.

2.14. Диференциация на костно мозъчни прекурсори до морфологични подобни на остеобласти клетки

Изолираните костно-мозъчни клетки (в концентрация 1×10^5) бяха преброени и разпределени по схема в 24 или 48 ямкови плаки. Към съответните ямки бяха добавени различни концентрации (4 µg/ml; 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0, 5 µg/ml; 0, 5 µg/ml; 0, 125 µg/ml) от изследваните екстракти. Половината от клетките бяха инкубирани с допълнителни стимули витамин С и β-Glycerophosphate disodium salt hydrate (Sigma-Aldrich; кат. No G9422-50g) за диференциация на остеобласти. Клетките бяха култивирани в продължение на 14 дни в среда за култивиране MEM (Minimum Essential Medium; Gibco, Gaithersburg, MD), съдържаща 10% FCS, 4 Mm L-глутамин, 50 Mm 2-меркаптоетанол и антибиотици. Разтварянето на субстанциите е описано по-горе. На всеки три дни бяха добавяни свежа среда и стимули. След четиринадесетия ден клетките бяха оцветени по метода на Ван Коса.

2.15. Диференциално оцветяване на клетки с кристал виолет

След периода на диференциация на остеокластите, средата за култивиране беше премахната и клетките бяха фиксирани за 5 минути в 10% буфериран формалин. Ямките бяха промити добре с дестилирана вода и беше добавен 1% воден разтвор на кристал виолет за 5 минути. Остатъците от несвързаното багрило бяха отстранени чрез неколккратно промиване с дестилирана вода. Оцветените клетки бяха анализирани на светлинен микроскоп Leica DMi8 чрез софтуерите Leica LAS X и Image J и чрез преброяване на многоядрените клетки.

2.16. Диференциално оцветяване на клетки по метода на Ван Коса

След периода на диференциация на остеобластите, средата за култивиране беше премахната и клетките бяха фиксирани за 5 минути в 10% буфериран формалин. След промиване на ямките с дестилирана вода, беше добавен 5% разтвор на сребърен нитрат и плаката беше облъчвана за 1 час с UV лампа. След премахване на сребърния нитрат и интензивно промиване на ямите с дестилирана вода беше добавен натриев тиосульфат (кат. No 10102-17-7) за 10 минути. Оцветените клетки бяха анализирани на светлинен микроскоп Leica DMi8 чрез софтуерите Leica LAS X и Image J.

2.17. Изследване на нивата на цитокини в кръвни серуми

Проследяването на количествата цитокини в серумите на експерименталните животни беше осъществено по метода на ензимния имуносорбентен анализ (ELISA) с търговски китове за IL-6 (кат. No 88-7064-22 на Thermo Fisher), IL-4 (кат. No 431104 на Biolegend) и TNF- α (кат. No 430915 на Biolegend) следвайки инструкциите на производителя.

2.18. Хистология на колянна става

Отпрепарираниите задни крачета на експерименталните животни бяха почистени от кожата и мускулатурата и поставени в буфериран разтвор на 10% формалин. Декалцификацията беше осъществена чрез два подхода.

2.18.1. Киселинна декалцификация

Една част от крачетата бяха обработени за 5 дни с Decalcifier I (Leica) за едновременно фиксиране и декалцифициране. След омекване на крачетата и промиване за 24 часа на течаща вода, изследвания материал беше съхранен в 70% етанол за последваща обработка.

2.18.2. Декалцификация с ЕДТА

Друга част от крачетата бяха фиксирани в буфериран разтвор на 10% формалин за две седмици, след което бяха прехвърлени в 10-20% разтвор от ЕДТА (кат. No:200-449-4) за период от един до два месеца при смяна на декалцифициращия агент на 5-7 дни. Степента на декалцификация беше проследена чрез реакция на утаяване на калциевите йони от разтвора, в който са били потопени костите. Към 50 µl разтвор на ЕДТА, в който са били потопени костите се добавя 1 ml цитратен буфер и 250 µl 5% буфер на амониев оксалат.

След приключване на декалцифицирането, крачетата бяха поставени в автоматичен тъканен процесор Leica TP1020 и подложени на дехидратиране чрез последователна преминаване през възходяща алкохолна редица (70% етанол, 80% етанол и 95% етанол за по 45 мин. всеки; 100% етанол за 60 мин.; 2 смени на ксиленов заместител Tissue-clear (Sakura Finetek Europe) за по един час; баня от течен парафин при 58 °C - 2 пъти по 1 час и трети път за цяла нощ). Тъканите бяха включени в парафинови блокчета и нарязани с ръчен ротационен микротом Leica RM2125 RTS (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) на срезове с дебелина 6-7 µm. За анализа и снимките на препаратите беше използван микроскоп Leica DM2000 и лицензияния софтуер Leica LAS X.

2.18.3. Оцветяване с хематоксилин и еозин

Общата хистологична оценка на находките беше извършена чрез оцветяване с хематоксилин и еозин (H&E). Предметните стъкла бяха инкубирани за 3 мин. с хематоксилин Gill II (Sigma, кат. No: GHS132), промити с дестилирана вода и диференцирани за 1 мин. в Scott's Tap Water (2 g/L Sodium Bicarbonate; 20 g/L MgSO₄; pH 8.3-8.7). След промиване, препаратите бяха оцветени с еозин (Sigma, кат. No: 150322-02-4) за 30 секунди. Последва промиване с вода и дехидратиране чрез възходяща алкохолна редица (70% етанол и 80% етанол за 1 минута всеки; 95% етанол за 3 мин.; 100% етанол за 6 мин. и ксиленов заместител за 5 мин). След изсушаване, на препаратите бяха монтирани покривни стъкла в среда за включване Vitro-Clud. Този тип оцветяване онагледява отрицателно заредените нуклеинови киселини (ядрата на клетките и рибозомите), като ги оцветява в синьо, а протеините (цитоплазмата) в розово.

2.18.4. Оцветяване с толуидиново синьо

За хистологична оценка на хрущялната тъкан на ставите, препаратите бяха оцветени с филтриран 1% разтвор на толуидиново синьо за 5 мин. След оцветяването препаратите бяха промити на течаща вода и дехидратирани с 96% и 100% етанол за по 2 мин, последвано от ксиленов заместител за 2 мин. След изсушаване на препаратите бяха монтирани покривни

стъкла в среда за включване Vitro-Clud. При този тип оцветяване, богатия на глюкозаминогликани и протеоглики хрущял се оцветява наситено синьо, а костта - в бледо синьо.

2.18.5. Оцветяване със Сафранин О

Друго специфично оцветяване за оценка състоянието на хрущялната тъкан беше приложено използвайки Сафранин О. Препаратите бяха инкубирани със смес от равни части от компоненти А и Б (съответно 1% Weigert's Iron Hematoxylin, кат. No 115973 и 29% Ferrous chloride, кат. No 7758-94-3) за 3 мин., след което, промити с дестилирана вода за 3 минути и оцветени с 1% Fast green (кат. No 2353-45-9) за 2 минути. Стъклата бяха промити с 1% оцетна киселина и в последствие потопени в дестилирана вода за 1 минута. След промиване, препаратите бяха оцветени със Сафранин О (кат. No 477-73-6) за 6 мин. След дехидратиране и покриване със среда за включване препаратите бяха анализирани за състояние на хрущяла, като гранулите на мастните клетки и муцина се оцветяват в оранжево или червено, цитоплазмата в зелено, а ядрата на клетките в черно.

2.18.6. Оцветяване по метода на Von Kossa

Беше извършено специфично оцветяване за наличие на аномално отлагане на калций в изследваните срези. Принципът на това оцветяване се основава на превръщането на калциевите соли в сребърни соли: калциевите йони, свързани с фосфати, се заменят със сребърни йони, доставени от разтвор на сребърен нитрат. Подготвените и депарафинирани срези бяха инкубирани с 5% сребърен нитрат (AgNO_3 Sigma, Lot 86h919) на тъмно. След трикратно промиване в дестилирана вода, препаратите бяха инкубирани в 5% бикарбонат ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$) под UV лампа. След промиване препаратите бяха дехидратирани и покрити със среда за включване Vitro-Clud. Участъците с аномално отлагане на калции се оцветяват в черно.

2.18.7. Оцветяване по метода на Масон Трихром

Този тип специфичното оцветяване беше използван за диференциране на колагенови и мускулни влакна. Препаратите бяха оцветени спазвайки протокола на производителя (BioGnost, кат. MST-100T). Този тип оцветяване позволява да се отличат много структури и тъкани, като ядрата се оцветяват в синьо-виолетово, мускулите, фибрите, кератина и цитоплазмата в светло червено, колагена и мукуса в синьо и еритроцитите в червено-оранжево.

2.18.8. Хистологична оценка

За оценка на степента на хистопатологичните промени в колянната става на експерименталните групи беше използвана OARSI система за оценка при остеоартрит (оценки между 0 и 4), базирана на хистологичните характеристики в хода на ОА [185]. **Лезии:** 0 - липса на лезии по повърхността на хрущяла; 1 - пукнатини по хрущяла, ограничени до повърхността и повърхностната зона; 2 - лезии, простиращи се в средната зона; 3 - лезии, което се простира до нивото на дълбоката зона; 4 - лезии, простиращи се до дълбоката зона; **образуване на хондрон:** 0 - без образуване на клъстери; 1 - два хондроцита (дублети) в рамките на една и съща лакуна по повърхността на хрущяла; 2 - двойки и тройки хондроцити в рамките на една и съща лакуна по повърхността на хрущяла; 3 - 3-4 хондроцита в рамките на една и съща лакуна по повърхностния участък на ставния хрущял; 4 - повече от четири хондроцита в рамките на една и съща лакуна; **васкуларизация:** 0 - нормално; 1 - слабо увеличение на кръвоносните съдове в местата на разреза; 2 - слабо увеличение на броя и разширението на кръвоносните съдове в целия участък; 3 - умерено увеличение (до 50 %) на броя и разширението на кръвоносните съдове в участъка; 4 - значително увеличение (над 50 % от участъка) на броя и разширението на кръвоносните съдове; **фиброза:** 0 - нормална; 1 - слаба фиброза в рамките на участъка; 2 - 25% от участъка, засегнат от фиброза; 3 - 25 до 50% от участъка, засегнат от фиброза; 4 - повече от 50% от участъка, засегнат от фиброза.

2.19. FACS анализ

Спленоцити в концентрация 2×10^6 кл/ml бяха разпределени по 100 μ l в епруветки за FACS. Към епруветките беше добавен по 1 ml FACS буфер и пробите бяха центрофугирани при 1200 rpm за 10 мин. на 4 °C. След отстраняване на супернатантата към клетките бяха добавени комбинации от антитела (виж т. 4 Антитела): за В-клетки, анти-CD19 антитяло; за Т-клетки, микс от анти-CD3, CD4, CD8 антитела; за активация на Т-клетки, микс от анти-CD3, CD4, CD25, и CD69 антитела; за активирани цитотоксични Т клетки, комбинация от анти-CD3, CD8, и CD107a антитела; за NK клетки, анти-CD3 и CD335 антитела; за активирани NK клетки, микс от анти-CD3, CD335, и CD107a антитела; за макрофаги, анти-F4/80 и CD11b антитела, за неутрофили, анти-CD11b и Ly6G антитела, след което пробите бяха инкубирани на тъмно и на лед за 20 мин. След двукратно промиване с по 1 ml FACS буфер бяха добавени по 400 μ l FACS буфер към всяка епруветка и анализирани на проточен цитрометър BD LSR II (BD Biosciences) чрез софтуер Diva 6. 1. 1. и FlowJo v.10. От всяка проба бяха анализирани 20 000 клетки.

2.20. Статистически анализ

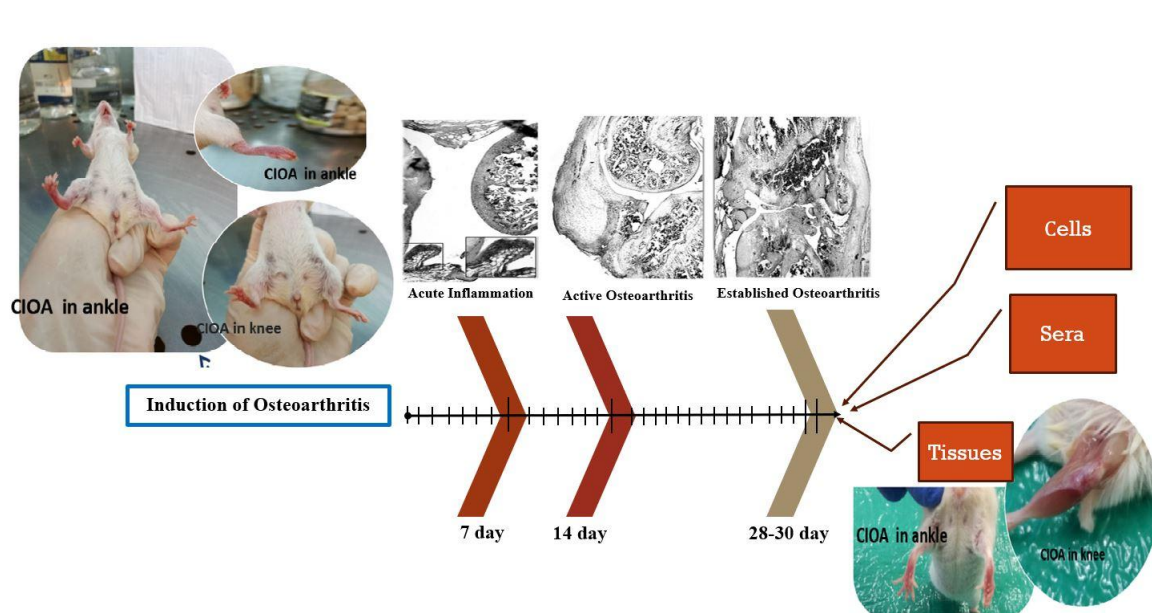
Статистическият анализ бе извършен със софтуер Prism (v.8 и v.9) на GraphPad (San Diego, CA, USA). За сравнение на две групи, на повече от две групи и за многовариантни анализи бяха използвани двустранният t-тест или тестът на Ман-Уитни, еднопосочен и двупосочен ANOVA тест с последващ тест на Тюки, на Крускал-Уолис и на Бонферони. За статистически значими се приемат стойности съответстващи на средната стойност $\pm$ SD, $p < 0.05$.

3. Резултати

3.1. Индуциране на експериментален миши модел на остеоартрит

Химическият способ за индуциране на остеоартрит, използван в настоящия дисертационен труд позволява проследяване на всички етапи в развитието на заболяването до окончателното му хронифициране в относително кратък времеви интервал от 28 - 30 дни. Този метод е онагледен на Фигура 1 и се отличава с добре диференцирани основни фази на прогресия:

- от деня на предизвикване до 7 ден - остра фаза;
- от 7 до 20 ден - активна фаза;
- след 28 - 30 ден - хронична фаза;



Фигура 1. Терапевтична схема и експериментален дизайн.

Разработването на модел беше осъществено върху мъжки и женски мишки в зряла възраст от 8 до 12 седмици. Най-често с остеоартрит се диагностицират колянната и глезенната става, но процента на пациенти със засягане на колянната става е по-висок. Емпирично беше установено, че поради анатомичните особености на ставите, колянната ставата позволява еднотипно въвеждане на ензима.

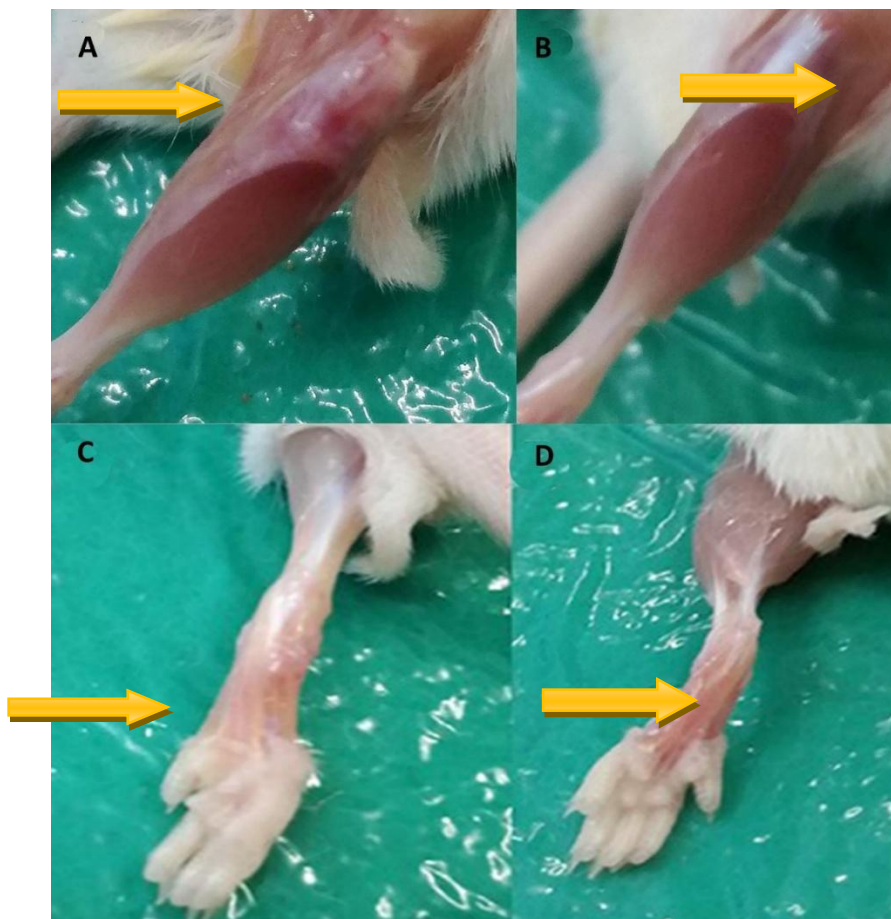
Проведено беше и ежедневно наблюдение на животни за проследяване симптоматиката и признаците на възпаление. Проявлението на острата фаза в двата вида стави е представено на Фигура 2, като подуването и зачервяването на глезенната става е отразено на А и В, а на С е представена колянната става на третия ден след инжектиране на ензима. Различията в ставите се забелязват с просто око. Добре се отличават промените в глезенната става (Фигура 2А и В), докато при колянното възпаление не е толкова забележимо (Фигура 2С). Подуването и зачервяването отшумяват след седмия ден от индуцирането на остеоартрита.



Фигура 2. Индуциране на остеоартрит в глезенната става (А и В) и в колянна става (С) на мишка Balb/c три дни след инжектирането.

В активната фаза на заболяването (между 7-ми и 20-ти ден) след остро възпаление се забелязва повишено кръвоснабдяване в областта на коленната става и много голяма нестабилност на лигаментите. В последващия етап на хронифициране на заболяването (след 27 - 30 ден) се отчита промяна в придвижването на животните, намаляване на възможността за разгъване на ставата, положението на ходилото и пръстите. Могат да се забележат промени във възможността за движение на пръстите.

Измененията в структурата на ставите представени на Фигура 3А са видими и преди последващия хистологичен анализ. Жълтите стрелки насочват вниманието към променената структурата на пателата (Фигура 3А) и нормалния и изглед (Фигура 3В). Подобно сравнение за отчитане на макроскопските изменения беше направено и при модела с индуциране на остеоартрит в глезенната става (Фигура 3С и D), но не бяха наблюдавани толкова отчетливи изменения.



Фигура 3. Хронична фаза (30 ден) в развитието на колагеназа-индуциран остеоартрит, (A) Индуциран артрит в колянна става; (B) здрава колянна става; (C) индуциран СЮА в глезенна става; (D) здрава глезенна става.

Последващият анализ на модела и патологичните изменения беше осъществен чрез хистологична оценка на находки в ставите на експерименталните животни през трите фази на остеоартрита.

3.1.1. Флоуцитометричен анализ на различни клетъчни популации в слезката на животни с експериментален СЮА

Проследяването на промените в спленоцититните, синовиалните и костно-мозъчните клетъчни популации при експерименталните животни през всички етапи на заболяването ни дава възможност да открием степента на активацията на различните имунни клетки. Бяха анализирани основни клетъчни типове – Б-лимфоцити, Т-лимфоцити, НК-клетки, миелоидни клетки и техни субпопулации.

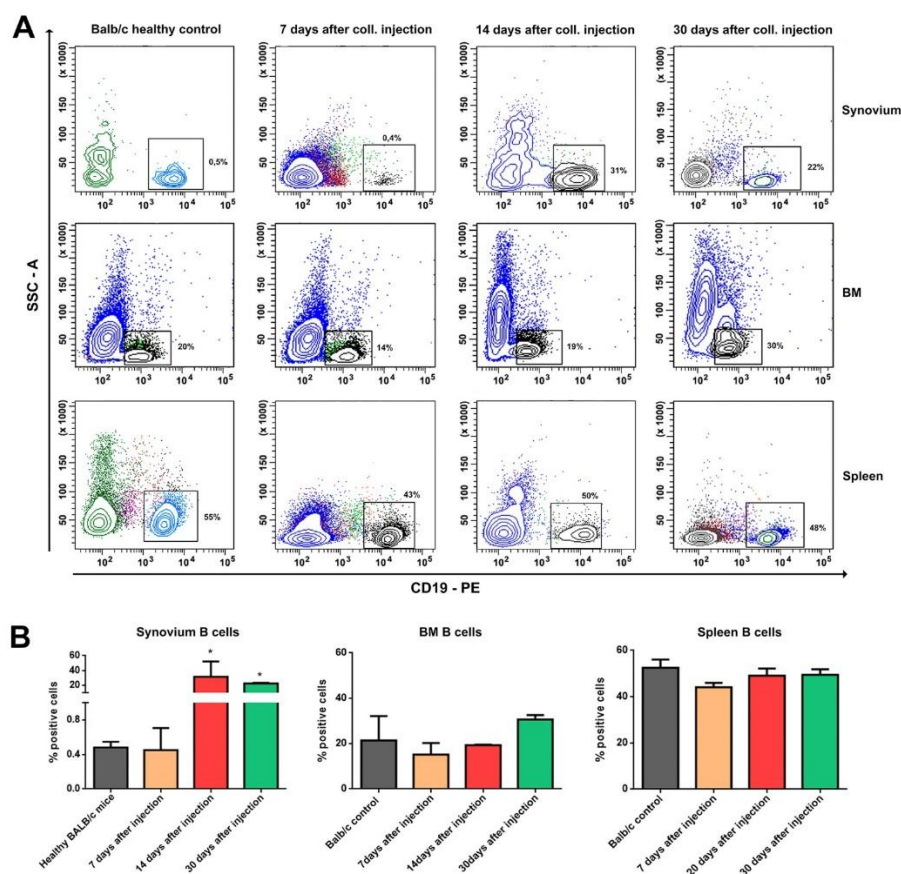
3.1.1.1. Б-клетъчна лимфоцитна популация

На Фигура 4 е представен сравнителният анализ на Б-лимфоцитната популация в синовиум, слезка и костен мозък на здрави Balb/c мишки и животни с СЮА на 7- ми, 14-ти и 30-ти ден след индуциране на заболяването. В синовиума на здравите животни процента на този

тип имунни клетки е нисък, като в острата фаза се вижда тенденция за повишаване на популацията. Най- високи стойности от 31% позитивни клетки се откриват на 14 -ти ден, където се открива статистически достоверна разлика спрямо здравите животни. В хронична фаза, процентът на Б-клетките се запазва статистически по-висок спрямо контролните животни, но се отчита тенденция за намаляване (Фигура 4А първи плот, Фигура 4В лява графика).

Б-клетъчната популация, изолирана от костния мозък показва тенденция за понижаване на 7–ми ден след индуциране на остеоартрит, в активната фаза (14-ти ден) резултатите са сходни с тези на здравата контрола, а на 30-ти ден се отбелязва повишаване на Б-клетките (Фигура 4А среден плот, Фигура 4В средна графика).

При спленоцитите само в острата фаза има леко подтискане на популацията, но през останалите етапи на заболяването резултатите са близки до тези на здравите мишки (Фигура 4А последен плот, Фигура 4В дясна графика).

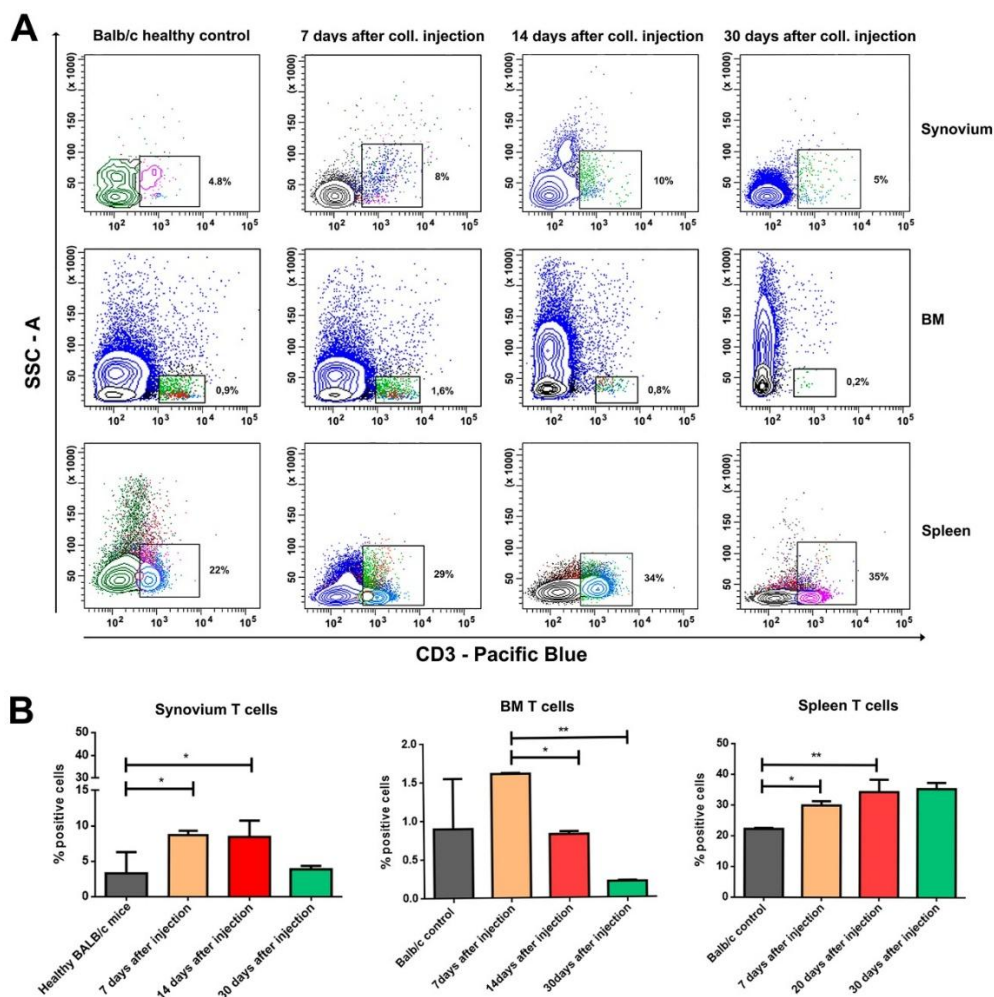


Фигура 4. Разпределение на В-клетките в синовиум, костен мозък и слезка по време на развитието на ОА. (А) Представителни диаграми на флоуцитометричен анализ на популацията от В клетки в синовиум, костен мозък и слезка при мишки на 7-и, на 14-и и на 30-и ден от развитието на ОА. (В) Обобщени данни за процента CD19 положителни клетки от всички групи (5 животни в група). Данните са представени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 5$). Данните са анализирани чрез two-way ANOVA, последван от Bonferroni's multiple comparison test $*P < 0.05$.

3.1.1.2. Т-клетъчни лимфоцитни популации

Анализът на CD3-позитивните клетки в синовиум, костен мозък и слезка показва повишаване на анализираната популация след индуциране на възпалението. В костния мозък беше отчетено двойно повишаване на Т-клетъчната популация по време на острата фаза в сравнение с контролните животни, след което намаляват, като в хронична фаза на възпалението процента им е по-нисък от контролната група. В синовиумът повишението беше наблюдавано в остра и активна фаза на заболяването, като в хронична фаза процента на CD3-клетките достига нивата на здравите животни.

Най-голямо увеличаване на процента CD3-позитивни клетки беше отчетено при спленоцитната популация през трите етапа на развитие на индуцираното възпаление (Фигура 5).



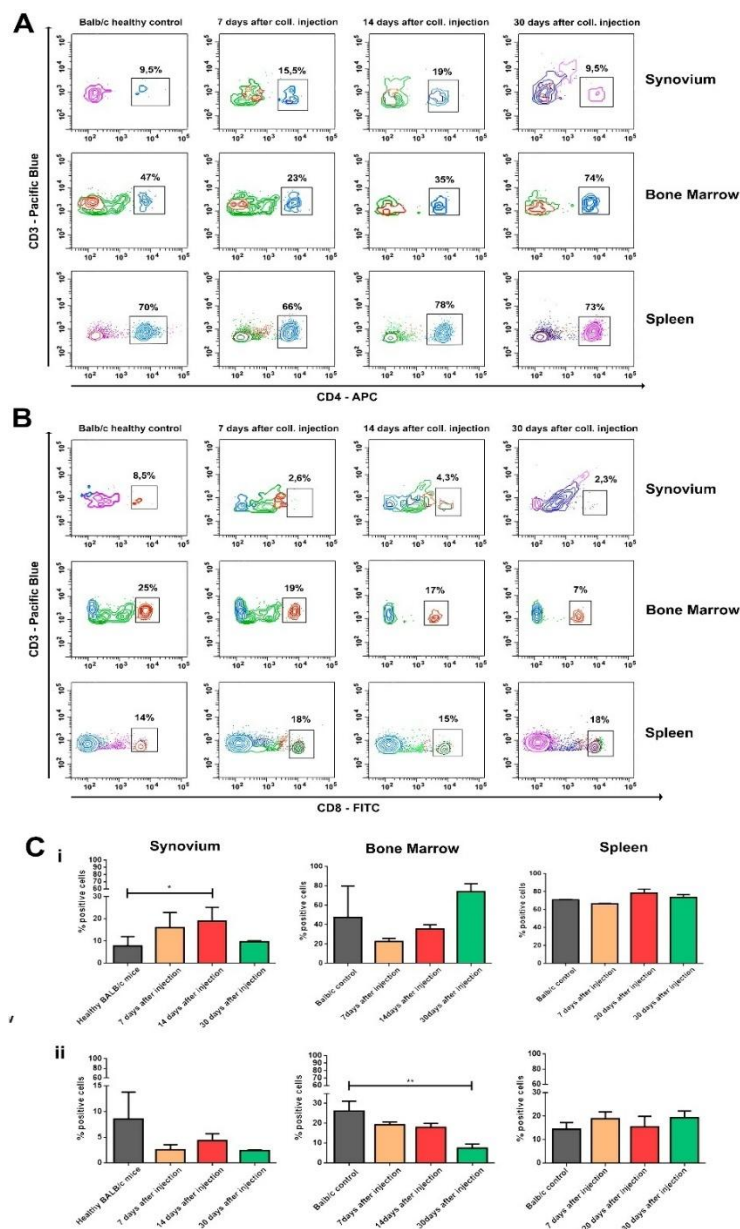
Фигура 5. Разпределение на Т-клетките в синовиумът, костния мозък и слезката през различните етапи на развитие на ОА. (А) Флоуцитометричен анализ на Т клетъчната популацията на 7-и, 14-и и 30-и ден от развитието на ОА. От всяка проба са анализирани десет хиляди клетки. (В) Графики на обобщените резултати от всички експерименти. Резултатите са представени като средно $\pm$ SD ($n = 5$). Данните са анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$.

Последващия анализ на ефекторните и цитотоксичните субпопулации от Т-клетки показва, че процента на CD3/CD4 позитивните Т-клетки в синовиума се увеличава при животните с остеоартрит спрямо контролните животни, докато при CD3/CD8 позитивните Т-клетки беше отчетено понижаване през всички етапи от заболяването (Фигура 6С (i) и Фигура 6С (ii) графиките в ляво).

Анализът на CD4 Т-клетките в костен мозък на 7-ми ден показва понижаване на клетъчната популация спрямо контролната група, като в следващите анализирани етапи процентът на CD4 Т-клетките беше повишен.

При CD3/CD8 клетъчната популация беше наблюдавана противоположна тенденция, изразяваща се в силно повишен процент на цитотоксичните клетки в острата фаза на развитие, който още на 14-тия ден достига процента при здравите животни (Фигура 6С (i) и Фигура 6С (ii), графиките в средата).

При спленоцитните изолати не беше наблюдавана промяна в проследените Т-клетъчни субпопулации през различните етапи от развитието на ОА (Фигура 6С (i) и Фигура 6С (ii), графиките в дясно).

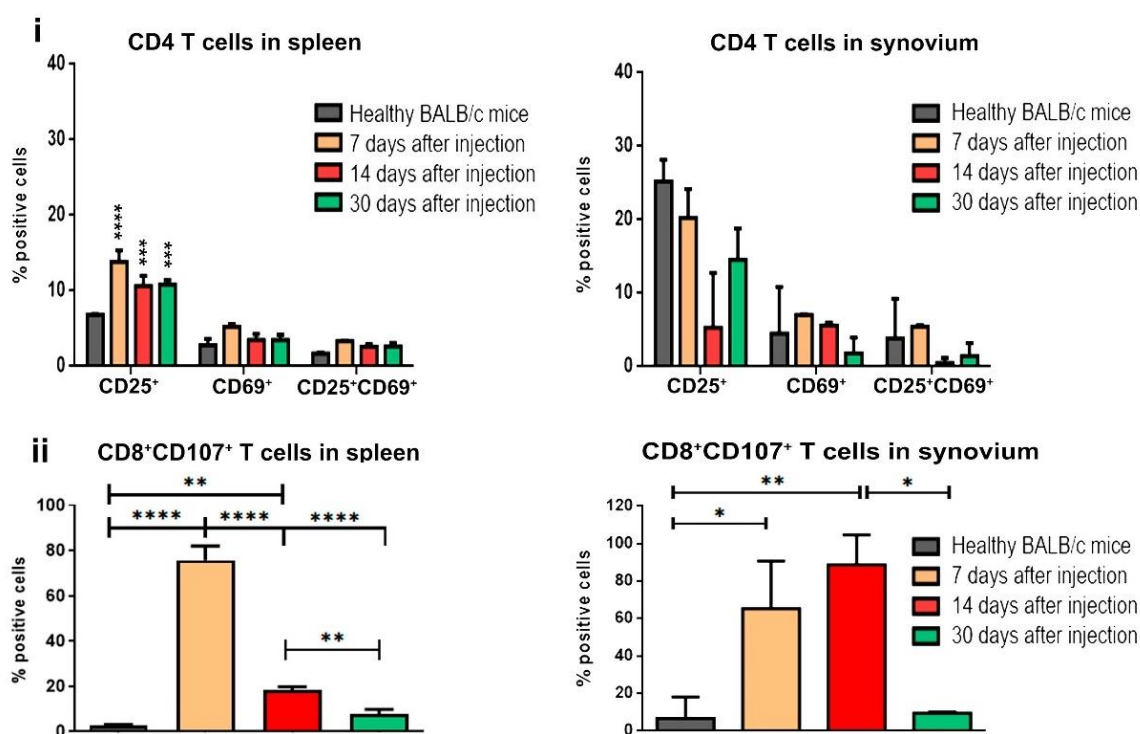


Фигура 6. Анализ с проточна цитометрия на клетъчната популация CD3/CD4 (A) и CD3/CD8 (B) в синовиума, костния мозък и слезката при мишки на 7-и, 14-и и 30-и ден от развитието на ОА. От всяка проба са анализирани десет хиляди клетки. Данните са представителни за поне 5 експеримента. (C) (i) Графично представяне на обобщените данни за CD3/CD4-позитивните клетки от всички експерименти. (ii) Графично представяне на обобщените данни за CD3/CD8-позитивните клетки от всички експерименти. Резултатите са представени като средно $\pm$ SD ($n = 5$). Данните са анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Нивата на Т-клетъчна активация бяха анализирани отчитайки степента на експресия на активационните маркери CD25, CD69 и CD107.

Въпреки липсата на разлика в процента на CD3/CD4 спленоцитната популацията спрямо здравите контролни животни, мишките с индуциран ОА имат значително повече активирани хелперни клетки (Фигура 7(i), лява графика). Такива повишени нива на активация не бяха

наблюдавани в популацията на CD3/CD4 T клетките при анализа на синовиума (Фигура 7(i), дясна графика).



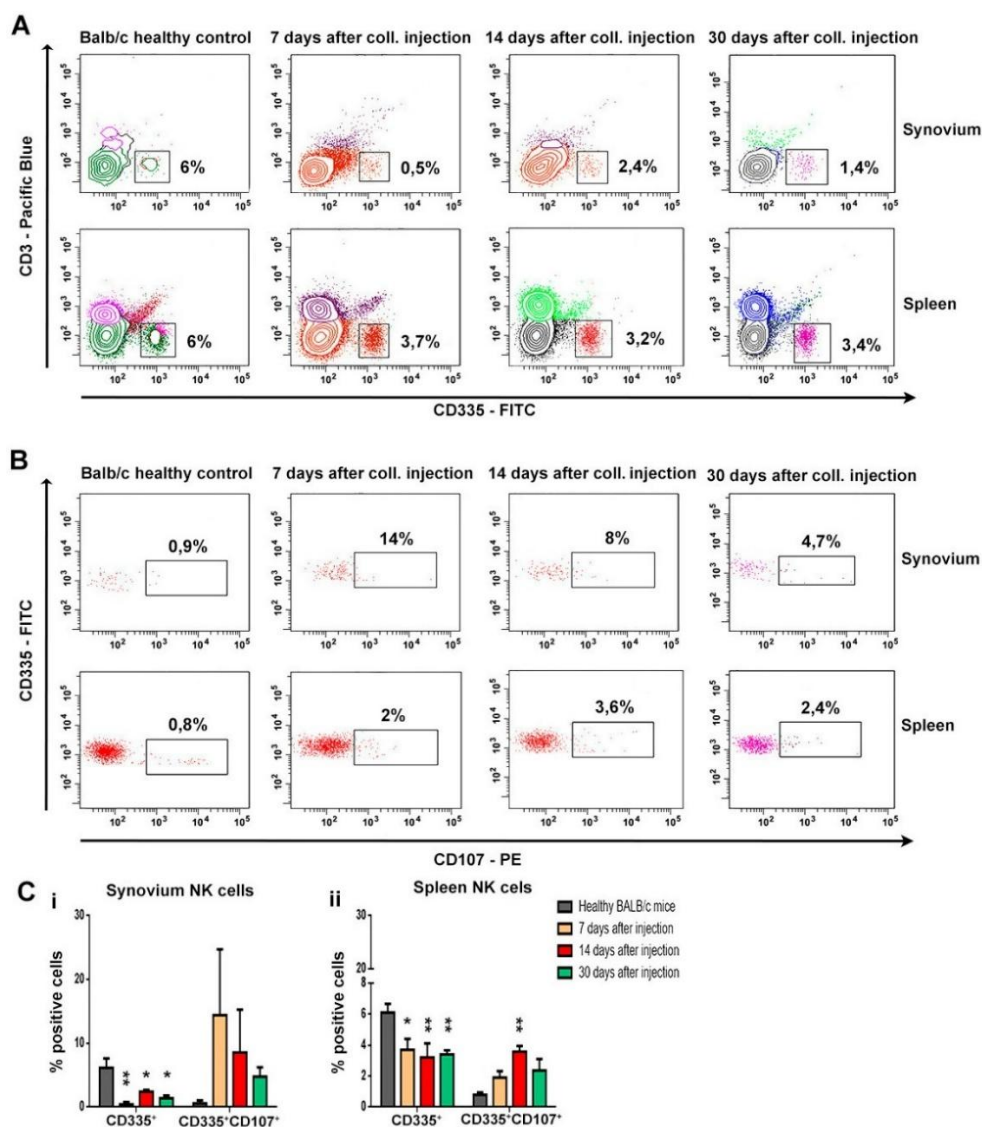
Фигура 7. Състояние на активиране на T-клетките в синовиума и слезката по време на ОА развитие: (i) графично представяне на обобщените резултати за степен на активация на CD3/CD4 T-клетки. (ii) графично представяне на обобщените резултати за степен на активация на CD3/CD8 T-клетки. Анализирани са десет хиляди клетки във всяка проба. Резултатите са представени като средно $\pm$ SD ($n = 5$). Данните са анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ и **** $p < 0,0001$.**

Като маркер за активирането на цитотоксичните T-клетки изследвахме експресията на CD107a (LAMP-1). Най-висока степен на активирани CD8 T-клетки в слезката бяха отчетени на 7-ми ден след инжектиране на колагеназа (Фигура 7 (ii), лява графика). Въпреки намаления процент CD3/CD8 T-клетки в синовиума спрямо здравите контроли, бяха отчетени повишени нива на експресия на CD107a в групите с ОА. Най-силна активация беше отчетена на 7-и и 14-и ден след индуцирането на ОА (Фигура 7(ii), дясна графика).

3.1.1.3. NK клетъчни популации

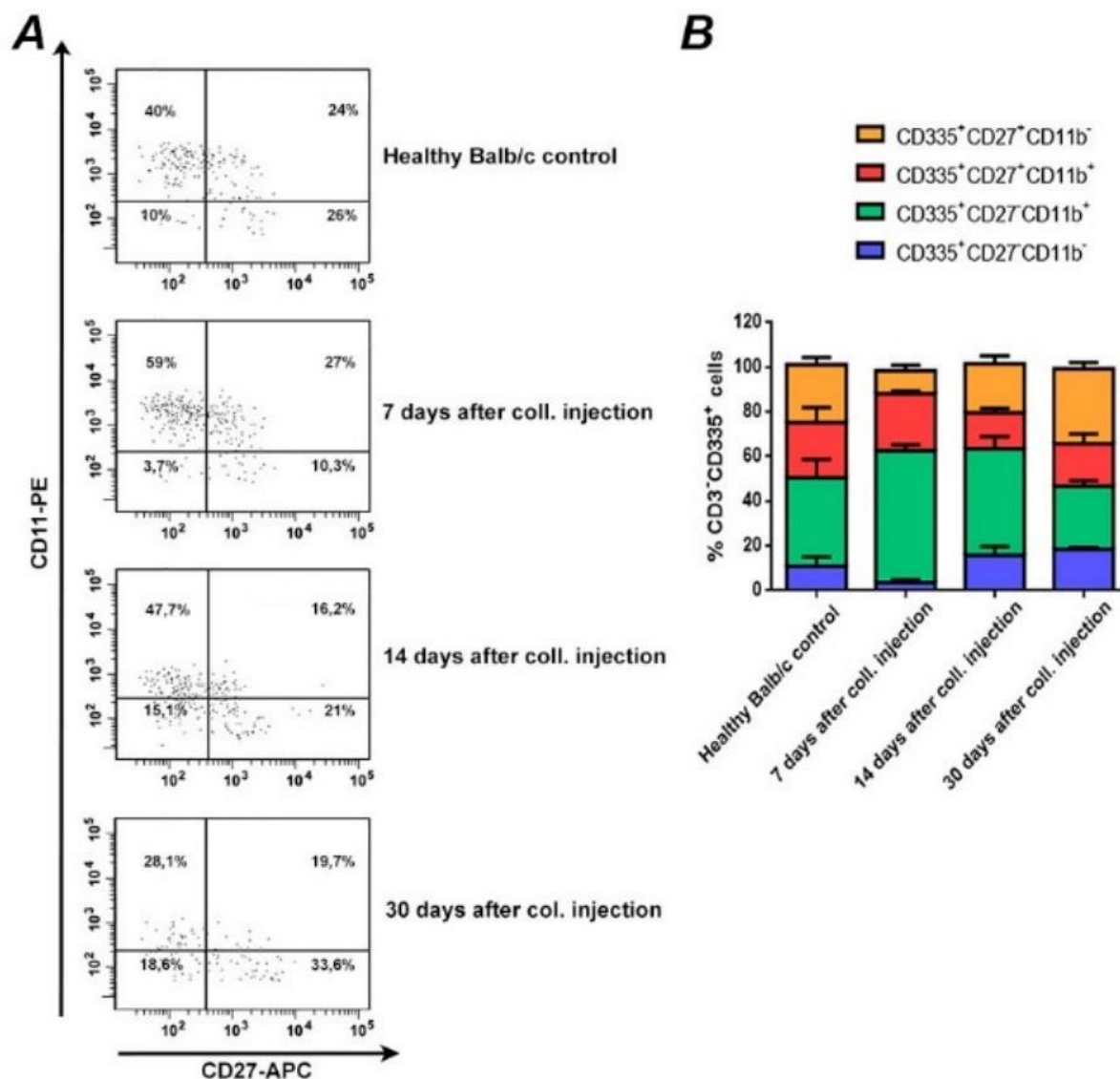
Бяха проследени промените в популацията на Natural Killer (NK) клетките, която беше селектирана чрез комбинация от антитела - негативни по CD3, но позитивни по CD335. Резултатите показват, че популацията на NK клетките в синовиума и в слезката на инжектираните с колагеназа животни е значително по-малка от тази на здравата контролна група (Фигура 8A, B). Изненадващо, тази малка популация е много активна поради високата

повърхностна експресия на CD107 (Фигура 8В, С). Двойно позитивните популации проявяват сходно поведение в етапите от развитието на остеоартрита, но в синовиума най-силна активация се наблюдава в острата фаза (7-ми ден), докато при клетките от слезката пика е в активната фаза (14-ти ден) (Фигура 8С). Така получените резултати кореспондират с вече доказаното твърдение, че NK клетките се пренасочват от слезката към мястото на възпаление. Доказано е, че приблизително 30% от $CD45^{+}$ мононуклеарните клетъчни инфилтрати в синовиалната течност на пациенти с остеоартрит съдържат NK клетки [186].



Фигура 8. Разпределение и степен на активация на NK клетките в синовиума и слезката в хода на ОА. Анализ с проточна цитометрия на популациите от $CD3^{+}CD335^{+}$ NK клетки (A) и $CD3^{+}CD335^{+}CD107^{+}$ NK клетки (B) в синовиума и слезката при мишки на 7-и, 14-и и 30-и ден от развитието на ОА. От всяка проба са анализирани десет хиляди клетки. Данните са представителни за поне 5 експеримента. (C) Извлечените резултати за $CD3^{+}CD335^{+}$ клетки (i) и за $CD3^{+}CD335^{+}CD107^{+}$ клетки (ii) от всички експерименти са представени графично. Резултатите са представени като средно $\pm SD$ ($n=5$). Данните са анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

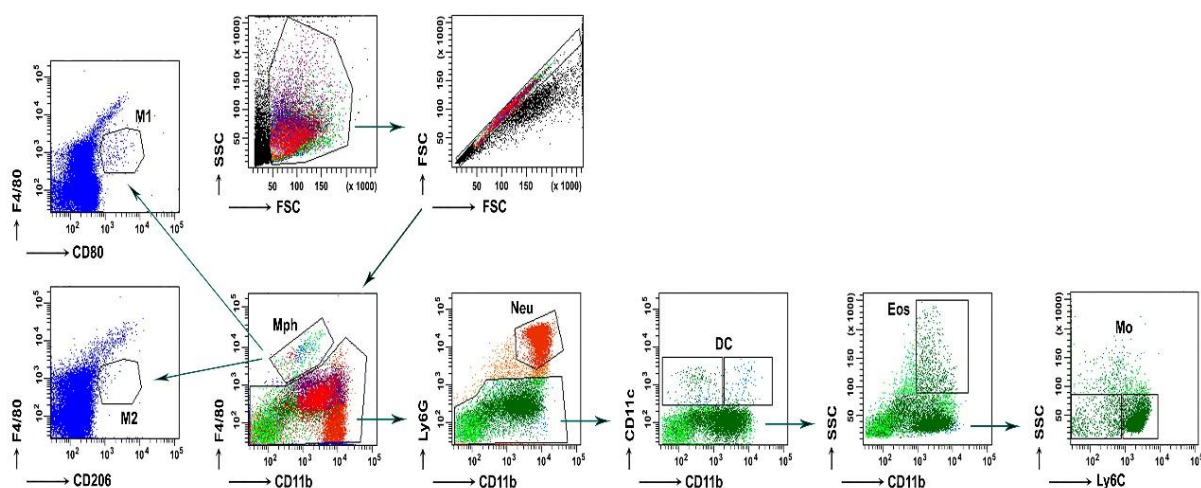
Анализът на костния мозък беше извършен чрез проследяване на НК субпопулации експресиращи специфични маркери в зависимост от тяхната функция: $CD335^+CD27^-CD11b^-$, $CD335^+CD27^+CD11b^-$, $CD335^+CD27^+CD11b^+$ и $CD335^+CD27^-CD11b^+$ (Фигура 9). Драстични промени бяха отчетени при $CD11b$ и $CD27$ профилите на НК клетките по време на развитието на ОА. През острата фаза преобладава популацията от цитотоксични НК клетки ($CD335^+CD27^-CD11b^+$), а в хроничната фаза НК клетки с фенотип $CD335^+CD27^+CD11b^-$ (Фигура 9B).



Фигура 9. Анализ на НК клетъчните субпопулации в костен мозък в хода на ОА по отношение на експресията на $CD11b$ и $CD27$. (A) Флоуцитометричен анализ на популацията $CD3-CD335^+$ НК клетки в костен мозък при мишки на 7-ия, 14-ия и 30-ия ден от развитието на ОА. (B) Графично представени обобщени резултати за процента на $CD3-CD335^+CD11b^{+/-}CD27^{+/-}$ НК клетки от всички експерименти. Резултатите са представени като средно $\pm SD$ ($n=5$). Данните са анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.1.1.4. Миелоидни клетъчни популации

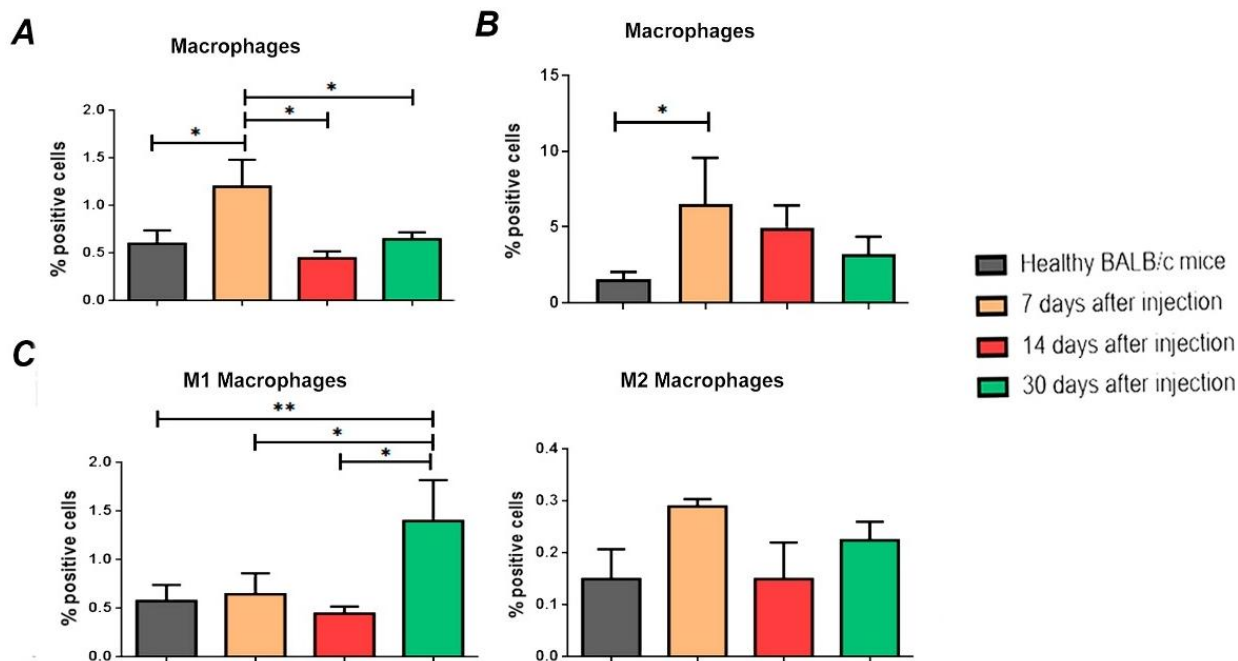
След вътре-ставното инжектиране на колагеназа, продуктите от разграждането на хрущяла се освобождават в синовиалната течност и се фагоцитират от синовиалните клетки. Възпалението благоприятства увеличаването и активирането на синовиални резидентни клетки и инфилтриращи имунни клетки. Чрез редица маркери проследихме състоянието на миелоидните клетъчни популации в костния мозък и синовиума по представената схема за дефиниране на клетките (Фигура 10).



Фигура 10. Проточен цитометричен анализ - стратегия за дефиниране на миелоидните клетъчни популации в синовиума и костния мозък на 7-и, 14-и и 30-и ден от развитието на ОА.

3.1.1.3.1. Макрофаги

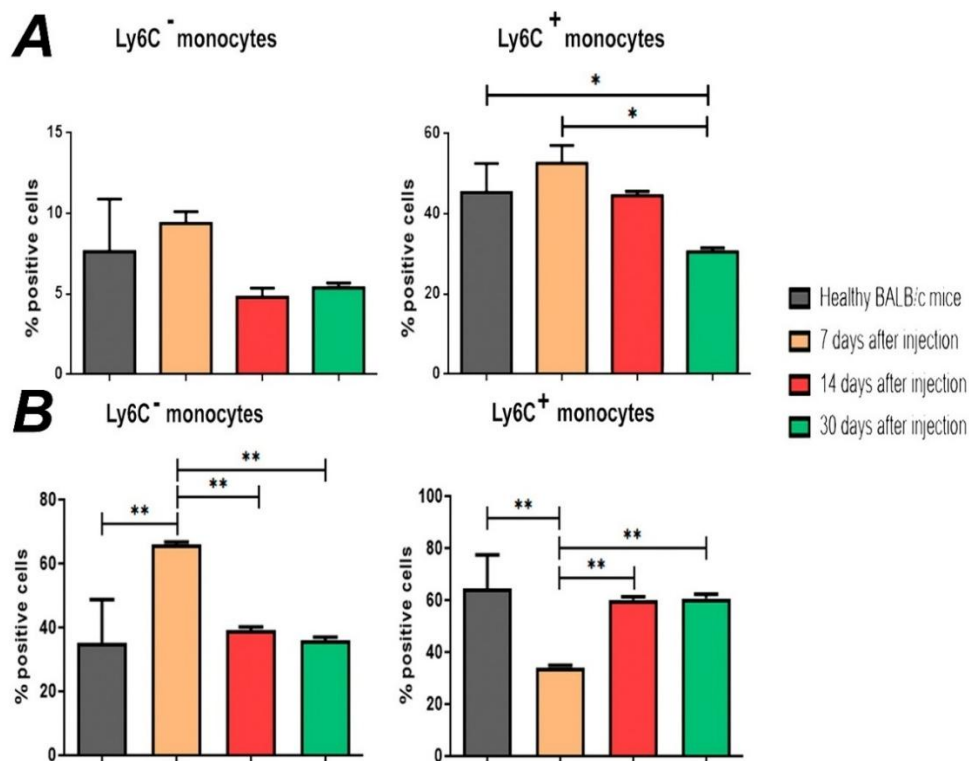
Макрофагите са силно хетерогенна група клетки, които променят функцията и фенотипа си в отговор на локалния стимул на средата или в отговор на такива от други имунни клетки. Анализът на F4/80-позитивните макрофаги в костния мозък на артритните животни показва, че в острата фаза статистически достоверно се увеличава процента им спрямо здравата контрола и постепенно намаляват през следващите фази на развитие (Фигура 11A). При синовиалните изолати се вижда същата тенденция, но по-плавно се възвръщат първоначалните нива в хроничния етап от ОА (Фигура 11B). Проследяването на макрофагиалните субпопулации M1 и M2 в костния мозък отразява умерено увеличение на популацията на M2 в острата фаза от развитието, но впечатление прави статистически-достоверното повишаване на M1 макрофагите в хроничната фаза на заболяването (Фигура 11C).



Фигура 11. Разпределение на макрофагите в (A) костния мозък и (B) синовиума при животни с индуциран ОА. (C) Разпределение на субпопулациите макрофаги в костния мозък по време на развитието на ОА. Резултатите са представени като средно $\pm$ SD ($n = 5$). Данните са анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.1.1.3.2. Моноцити

Обикновено резидентните макрофаги в синовиума са отговорни за поддържането на хомеостазата на ставите и комуникацията между различните клетъчни типове. При възпалителни условия, като например колагеназа-индуциран остеоартрит моноцитите са клетъчният тип, който има много комплексна роля. След диференцирането на моноцитите от хемопоетичните стволови клетки могат да се разграничат две функционално различни подгрупи моноцити: провъзпалителни $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ и патрулиращи Ly6C^{low} моноцити. На мястото на увреждането моноцитите могат да се диференцират в M1-подобни провъзпалителни или M2-подобни противовъзпалителни макрофаги в зависимост от сигналите на околната среда. В нашия модел наблюдавахме висок процент Ly6C^{low} привлечени към синовията (Фигура 12B). Това е свързано с по-високия процент $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ моноцити, които се намират в костния мозък и при освобождаване им оттам в циркулацията могат да се трансформират в Ly6C^{low} моноцити (Фигура 12A).



Фигура 12 Разпределение на моноцитите в (A) костния мозък и (B) синовиума при колагеназа-индуциран ОА. Данните са представени като средно $\pm$ SD ($n=5$). Резултатите са анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.1.1.3.3. Неутрофили

Беше отчетен и ефектът на колагеназа-индуцирания ОА върху неутрофилната популацията чрез увеличаването ѝ в костния мозък, седем дни след индуцирането (Фигура 13А, лява графика). В синовиумът беше отчетено и много по-добре изразено и статистически достоверно намаляването на същия тип клетки в хода на болестта (Фигура 13В, лява графика).

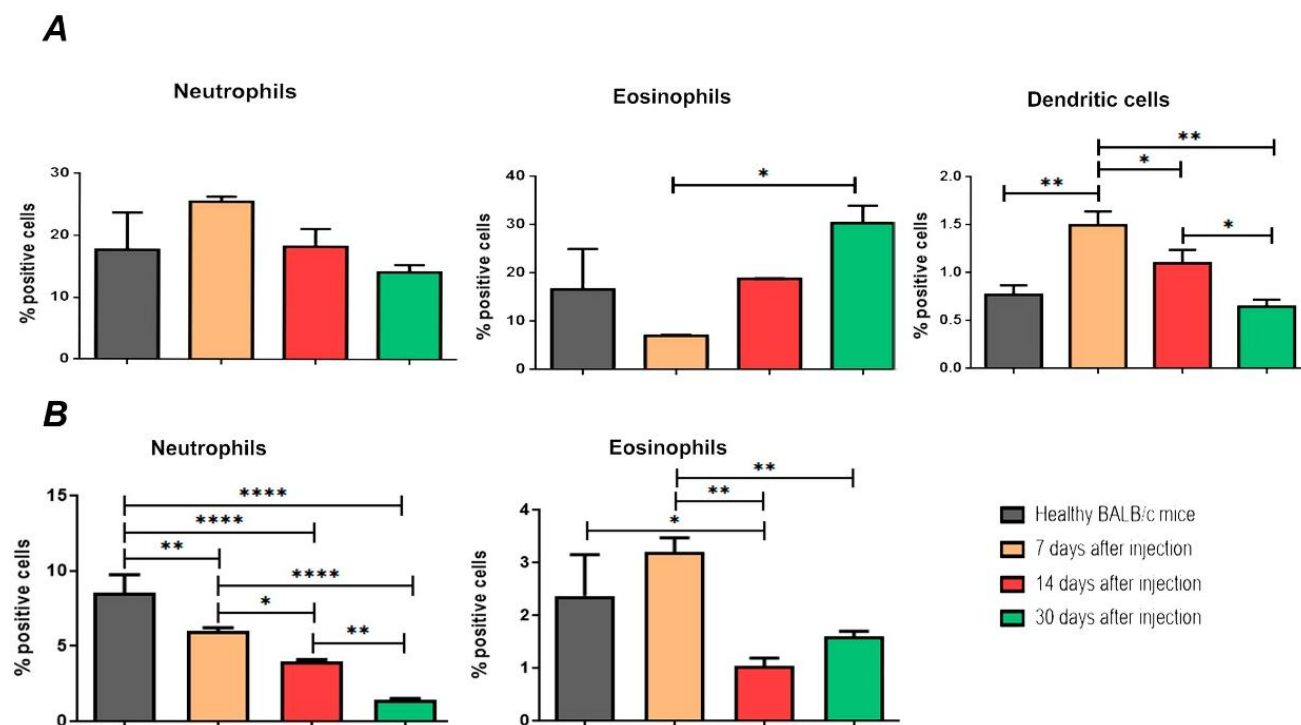
3.1.1.3.4. Еозинофили

Еозинофилите са нетипична клетъчна популация за колагеназа-индуцирания модел на ОА. Ограничен брой проучвания разглеждат значението на еозинофилите в патогенезата на ОА. В нашето проучване, седем дни след индуцирането на ОА популацията на еозинофилите е повишена в синовиума, последвано от намаляване към края на наблюдението (Фигура 13В, среден панел). В същото време точно обратната тенденция беше установена в костния мозък (Фигура 13А среден панел).

3.1.1.3.5. Дендритни клетки

Малко се знае за ролята на дендритните клетки (ДК) в имунопатогенезата на ОА. Техният потенциал за периферна толерантност и възможността да се превърнат в регулаторни клетки при определени обстоятелства биха могли да се използват като инструмент за елиминиране на

имуно-инфламаторните прояви при ОА. Анализирахме популацията от CD11b⁺CD11c⁺ клетки в костния мозък и установихме увеличен процент на клетките, експресиращи тези маркери на седмия ден от ОА (Фигура 13А, десен панел). Не открихме същата клетъчна популация в синовията.



Фигура 13. Разпределение на неутрофили, еозинофили и дендритни клетки в (A) костния мозък и (B) синовиум по време на развитието на ОА. Данните са представени като средно $\pm$ SD (n=5). Данните са анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

3.1.2. Анализ на хистологичните изменения на колянната става в следствие индуциране на СЮА.

3.1.2.1. Хистология на колянна става от здраво животно

Нормалната структура на колянната става е отправна точка за дефинирането на измененията, предизвикани от модела на колагеназа-индуциран остеоартрит. Основни патологични характеристики, които се променят в хода на развитието на остеоартрита са в хрущялната цялост, хондроцититните популации, морфологията на синовиалната мембрана, състоянието на вътре-ставната кухина и образуването на патологични кръвоносни съдове.

На Фигура 14 е представена извадка на измененията, които настъпват в колянната става през трите основни фази на развитие на колаген-индуциран ОА. Хистологичният анализ беше направен по описаните по-горе методи и способности (Виж Материали и методи). На снимки а, е, i от фигурата е представена хистологична находка на колянната става на здрава мишка със зрял

скелет. Беше наблюдавана характерната за хрущяла правилна дъговидна форма с наличие на хондроцитни клетки във всичките му слоеве, GAG, PG, които са индикатор за плътността и здравината на хрущяла. Показана е и нормалната пореста структура на синовиума без натрупване на калцификация и без патологично образуване на кръвоносни съдове.

На всеки етап от развитието на заболяването бяха жертвани животни за да се проследят и охарактеризират отделните етапи и промените в структурите на хрущяла и синовиума. Беше отчетена и степента на засягане на ставата.

3.1.2.2. Хистология на колянна стана в остра фаза на възпалението при СЮА

Проведените специфични хистологични оцветявания дадоха възможност да бъде направена обща хистологична оценка на препаратите и беше показано възпаление на синовиума още на 7-ден след инжектиране на колагеназата (остра фаза). Наблюдава се умерена инфилтрация на мононуклеарни клетки в синовиума (Фигура 14(i) b – черна стрелка). Отчетено е и частично разрушаване на хрущяла (Фигура 14(i) b - пунктиран правоъгълник). Оцветяването с Толуидиново синьо разкрива намаляване на хушялното съдържимо още в ранните етапи на възпалението (Фигура 14(ii) f), а с прогресията на заболяването синовиалната тъкан става хиперцелуларна и вакуолизирана.

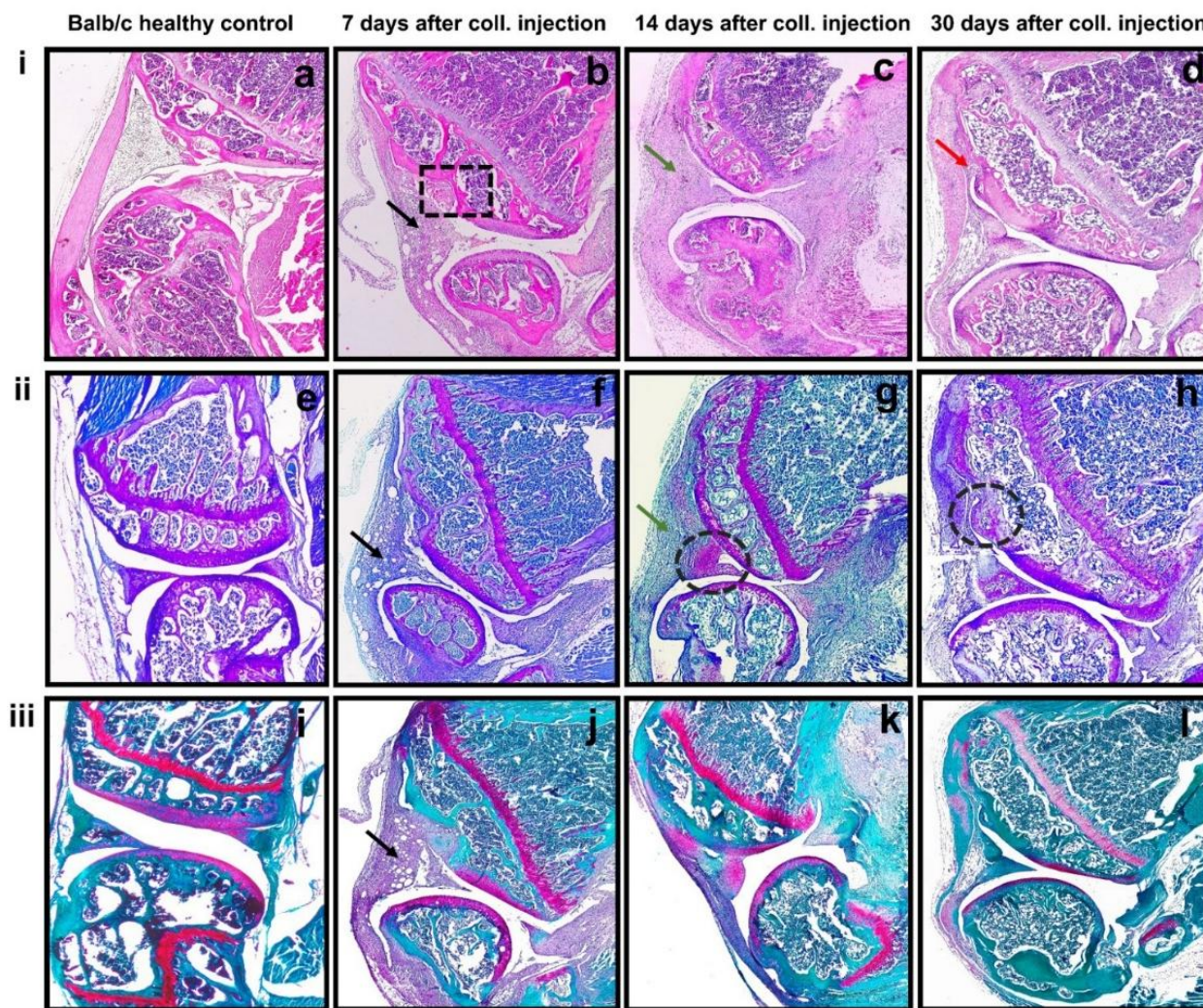
3.1.2.3. Хистология на колянна стана в активна фаза на възпалението при СЮА

Хистологичния анализ на колянната става през активната фаза на заболяването (14 -20 ден) показва изключително силно проявление на възпалителния процес, деструкция и ремоделиране на основните структури съставляващи ставата.

Драстично се променя структурата на синовиума. Хомеостазата, осигуряваща нормалното функциониране на синовиалната мембрана е изменена, многократно е увеличен обема ѝ в резултат на увеличаване на синовиалните инфилтрати. Тази хиперплазия превръща синовиума в панус, като благоприятства инвазията на костта и хрущяла (Фигура 14(i, ii) c, g – зелена стрелка). Видимо е редуцираното оцветяване по Safranin O, което говори за загуба на протеогликани (PGs) и глюкозаминоглекани (GAGs) (Фигура 14(iii) k).

В субхондралната кост, остеокластите засилват процесите на разрушаване на костта. В резултат от ерозията на костта и увеличането на остеобластите се формират остеофити (Фигура 14(ii) g – пунктиран кръг). Ясно се отличава деструкцията на хрущяла спрямо здравото животно (Фигура 14a, e, i). Формата на хрущяла, структурата на синовиума, струпването на остеокласти и остеобласти са основни показатели, които дефинират развитието на остеоартрита. Картината

на възпалението допълнително се усложнява от формирането на така наречената „bubble bone“-струпване на остеокласти на много малко разстояние, които деструкторират участък от костта и формират лакуни - дупки в костта, резултат от способността на остеокластите да разрушават костта, като синтезират и освобождават концентрирана солна киселина.



Фигура 14. Хистологичен анализ на колянната става след вътреставно инжектиране на колагеназа тип IA. (i(a-d)) оцветяване с хематоксилин и еозин; (ii(e-h)) оцветяване в толуидиново синьо; (iii(i-l)) оцветяване в сафранин O. Клетъчна инфилтрация на синовиума - черна стрелка; частично разрушаване на хрущяла - пунктиран правоъгълник; образуване на панус - зелена стрелка; образуван остеофит - пунктиран кръг; разрушаване на хрущяла и на субхондралната кост - червена стрелка; (увеличение $\times 40$).

3.1.2.4. Хистология на колянна стана в хронична фаза на СЮА

В хода на възпалението, на етап хронифициране, синовиалната мембрана в още по-силна степен хиперплазира и хипертрофира, допълнително се променя състава ѝ. В сравнение с ден 7 изцяло се загубва структурата и хомеостазата ѝ, като нормалната ѝ функция изцяло се изменя. На ден 14 размера на синовиума е много по-голям от този на ден 7, а на ден 30 освен покрай

двата хрущяла, мембраната се разраства и във вътреставното пространство. Наблюдаваната засилена ангиогенеза още в активната фаза на 30-ти ден след индуциране на заболяването е много по-засилена. Ясно се забелязва срастване на синовиума и костта, както и много силна деструкция на хрущялните повърхности в резултат на прогресията на СІОА.

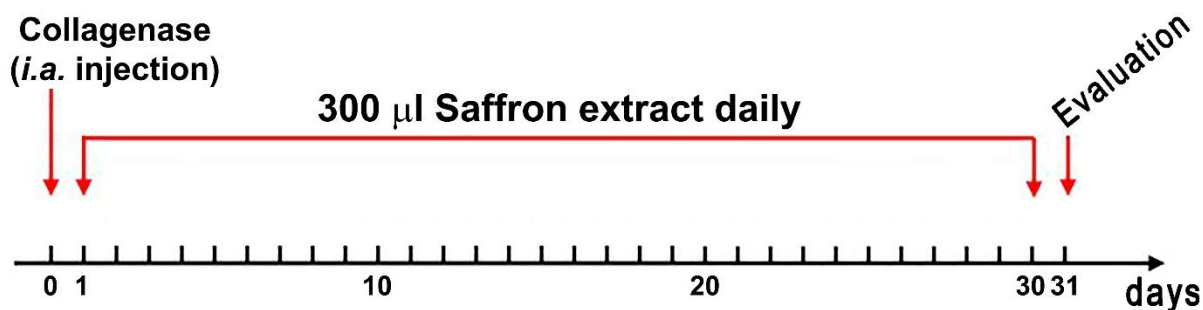
През хроничната фаза все още се откриват активни остеокласти. В активната фаза на заболяването остеобластите са еозинофилни, докато на 30 ден освобождават концентрирана солна киселина, разграждайки участъци от ставата. На места се откриват сраствания между отделните остеофити, което силно намалява подвижността на ставата. В допълнение се вижда тотално разрушаване на гъбестата кост в кортикалната област на фемура, което води до „сливане“ на възпаления синовиум и костния мозък (Фигура 14(i) d - червена стрелка).

Въпреки, че на 30-ти ден СІОА е в хронична фаза, на препаратите се виждат малки тепърва развиващи се остеофити, т.е., подвижността на ставата продължава да намалява. За последващата оценка на големината и броя на формираните остеофити беше проследено количеството протеоглики (PGs). Ясно личи загубата на глюкозаминогликаните, най-силно изразена в хроничната фаза от протичане на заболяването. Промяната в интензитета на оцветяванията с толуидиново синьо и Сафранин О отразява степента на намаляване на GAG и PG (Фигура 14(iii) l).

Получените резултати от комплексния имунологичен анализ на индуцирания модел на остеоартрит чрез колагеназа тип ІА ни предоставя много добра платформа за тестване на потенциалния анти-ревматичен ефект на избраните природните продукти, тема на настоящия дисертационен труд.

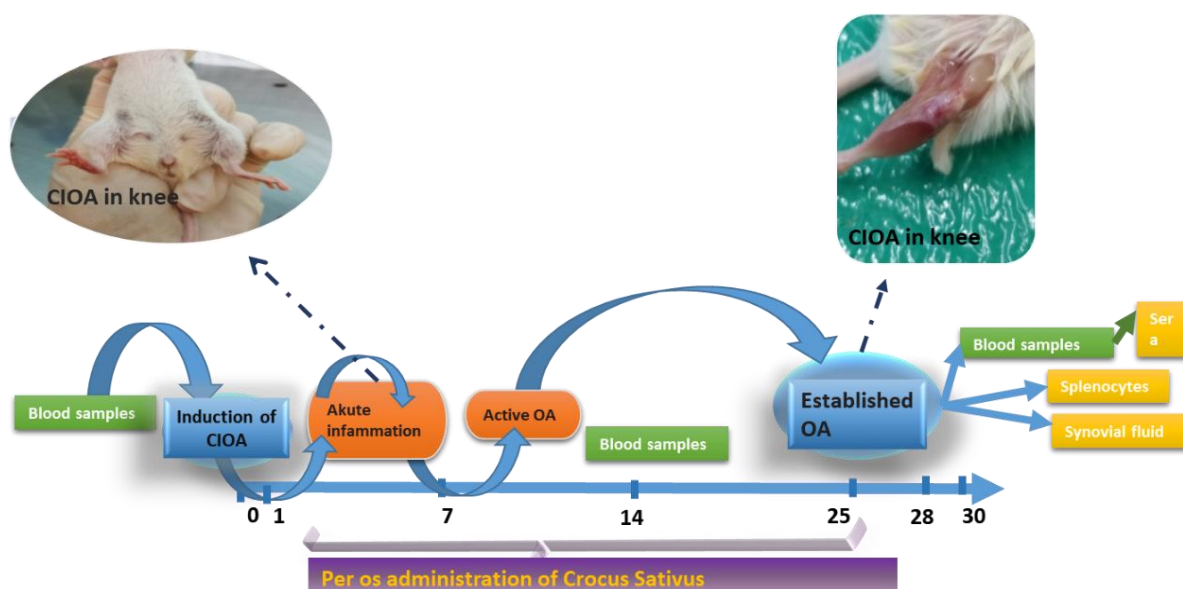
3.2. Проследяване ефектите на екстракт от *Crocus sativus* върху патогенезата на колагеназа-индуциран остеоартрит при експериментален миши модел

Беше разработена схема за третиране на животни с колагеназа-индуциран остеоартрит с различни концентрации на екстракт от шафран. След задълбочено проучване на екстракта от шафран, приложихме 30 дневна терапия с различни концентрации от активното вещество. Така обхванахме всички етапи от развитие на болестта (Фигура 15). Стартирахме експерименти с инжектиране на колагеназа в колянната става по описаната методика в раздел материали и методи.



Фигура 15. Схема на третиране животни с CIOA и екстракт от *Crocus sativus*.

След 30 дневна терапия животните бяха жертвани и беше направен анализ на въздействието на екстракта от шафран върху хистопатологичните изменения в ставите на експерименталните животни, ефекта върху пролиферативната и апоптотичната активност на изолираните клетъчни популации, както и въздействие върху секрецията на провъзпалителни и противовъзпалителни цитокини (Фигура 16).

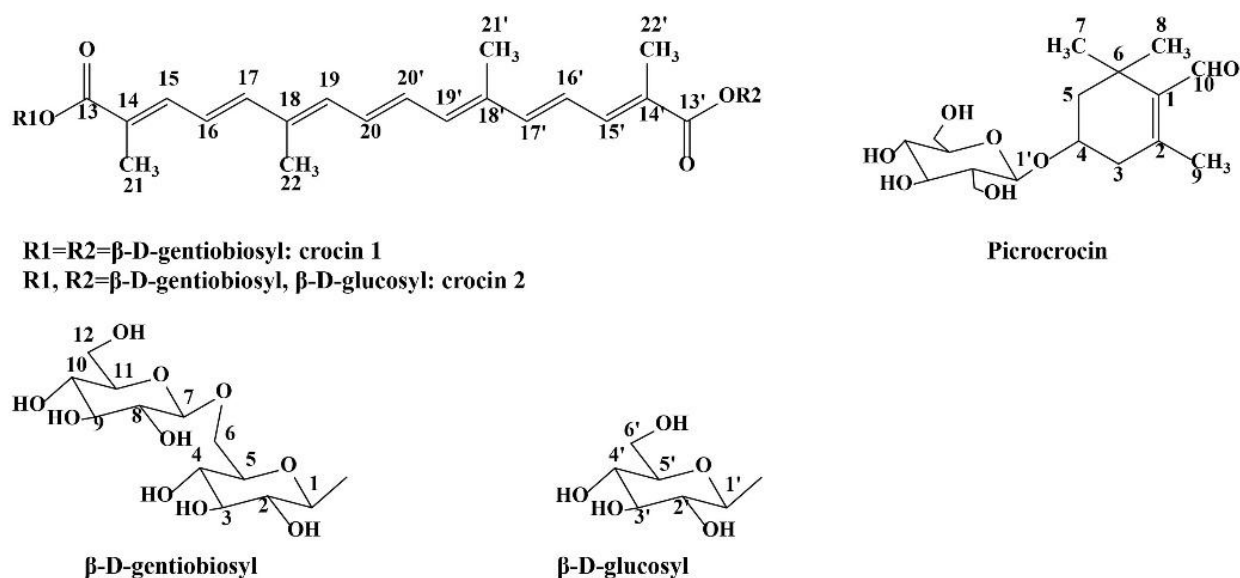


Фигура 16 Обща схема на експеримента.

3.2.1. Анализ на екстракта от *Crocus sativus*

Типичният цвят, вкус и аромат на шафрана се дължат на следните три съединения: кроцини (гликозилирани апокаротеноиди със захарни остатъци, като глюкоза и гентиобиоза), отговорни за силния оцветяващ капацитет, пикрокроцин (глюкозилиран монотерпен, предшественик на шафранал), който придава горчив вкус и шафраналът (монотерпенов алдехид,

получен от химическата или ензимната дехидратация на пикрокроцин по време на сушене и съхранение на шафрана), който допринася за характерната му миризма и аромат (Фигура 17).



Фигура 17. Основни вторични метаболити в *C. sativus*.

Метаболитното профилиране, както и идентификацията на метаболитите в етанолния екстракт от *C. sativus* бяха извършени посредством метаболомика, базирана на ядрено-магнитния резонанс (ЯМР), съгласно утвърдена методика в Департамент Биотехнология на Институт по Микробиология, филиал гр. Пловдив. Тези анализи не са тема на настоящата труд.

От проведените анализи е определено и количественото съдържание на основните метаболити в *C. sativus* (Таблица 1).

Метаболит	Съдържание, mg/g екстракт	Съдържание, mg/g суха маса
Кроцин 1	1.82 ± 0.04	1.04 ± 0.02
Кроцин 2	0.60 ± 0.07	0.35 ± 0.04
Пикрокроцин	1.99 ± 0.04	1.14 ± 0.02

Таблица 1 Съдържание на активните вещества в екстракта от *C. Sativus*, използван за терапията.

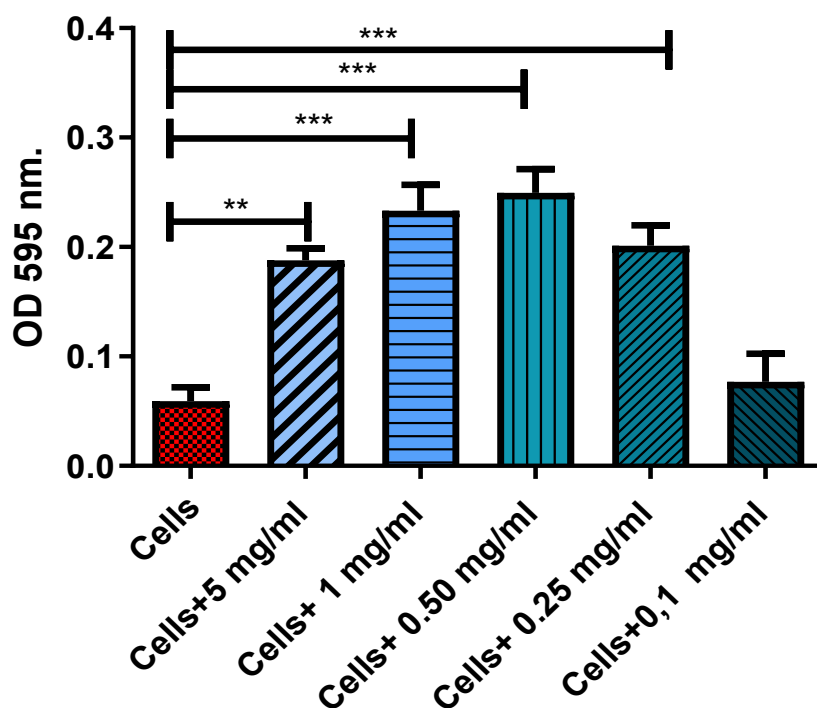
Разнообразието и съотношението на съставките на шафрана зависят от много фактори, включително условията на околната среда, процесите на сушене и времето на съхранение. Методите за бране и обработката след прибирането на реколтата могат да окажат влияние върху метаболитното съдържание на шафрана.

Шафраналът е съединение, образувано при ензимна загуба на глюкоза от пикрокроцин и се образува само докато шафранът се суши. По този начин различните методи на сушене, като

например на сянка, на слънчева светлина, в традиционна система за сушене или др. подход, биха оказали влияние върху съдържанието на шафранал. Доказано е, че съдържанието на шафранал варира значително в пробите от шафран - от количества под LOQ до 2, 1 mg/g шафран. В нашите експерименти шафраналът не беше открит в анализирания екстракт или съдържанието му беше под границата на количествено определяне.

3.2.2. Ефект на екстракта от *Crocus sativus* върху пролиферацията на спленоцити *in vitro*

Беше проведен пролиферативен тест за анализиране ефекта на екстракта от шафран върху спленоцитна суспензия от здрави Balb/c мишки (Фигура 18).



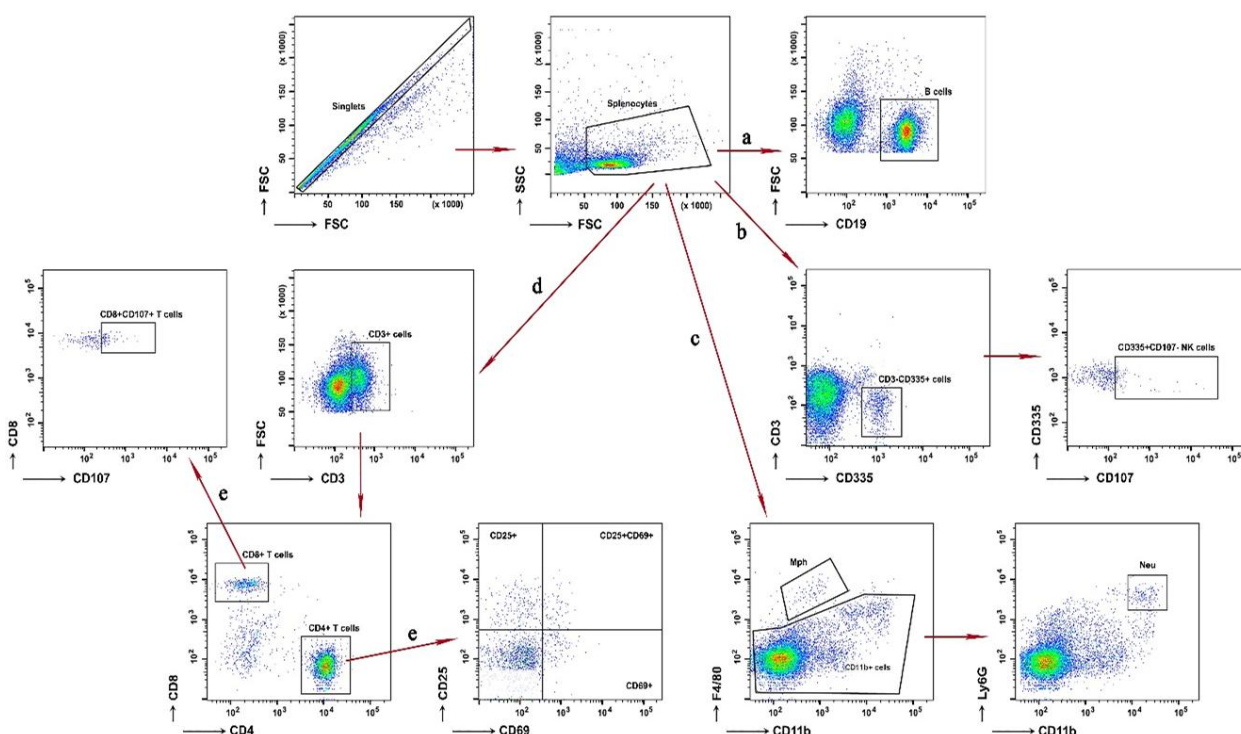
Фигура 18. *In vitro* пролиферация на спленоцити на здрави, нетретираны Balb/c мишки. Клетки в концентрация 1×10^6 клетки/мл бяха прехвърлени в 96 ямкова плака и инкубирани с различни концентрации на екстракта от *C. sativus* за 72 часа. Четири часа преди края на инкубацията беше добавено багрило MTT и след добавяне на солвента DMSO беше измерена абсорбцията на цветната реакция при дължина на вълната от 595 nm. Статистическият анализ е извършен чрез ANOVA тест, *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; Представителен резултат от трикратно повторен експеримент.

Клетките бяха изолирани и пречистени по описаните по-горе методи (виж Материали и методи), като 1×10^6 клетки/мл бяха инкубирани в присъствието на различни концентрации от анализирания екстракт в продължение на 48 и 72 часа. Както се вижда на фигурата, на 72 час от култивирането на спленоцитите в присъствието на нарастващи концентрации от екстракта не беше наблюдавано понижаване в пролиферативния потенциал на клетките, дори отчетохме

дозозависимо увеличение на клетъчната пролиферация в сравнение с клетки култивирани само в среда. Същата тенденция беше наблюдавана и при пролиферативния тест на 48 час (резултатите не са показани).

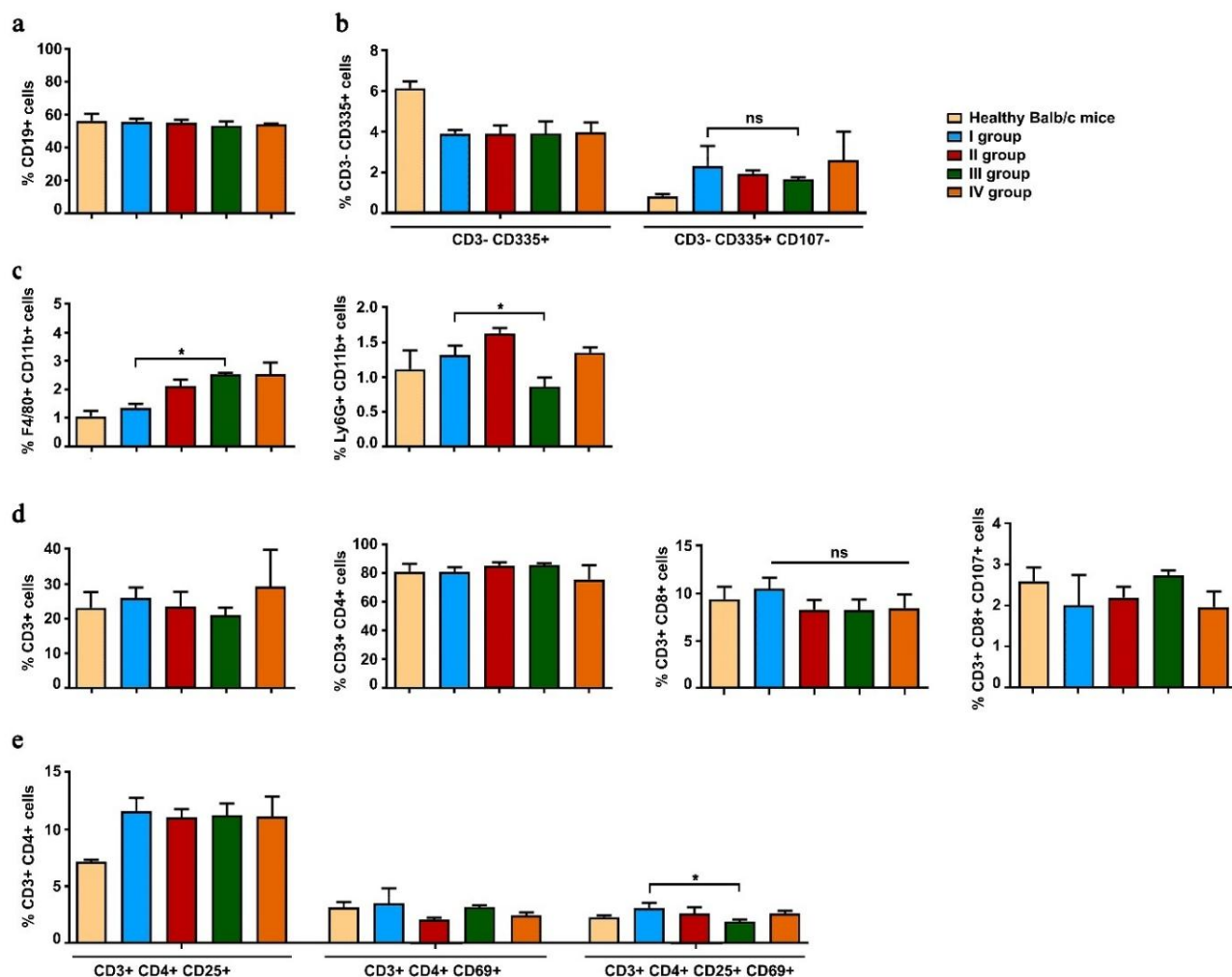
3.2.3. Флуцитометричен анализ на основни спленоцитни популации

Количествената оценка на основните клетъчни популации на слезката беше извършена чрез FACS анализ. Стратегията за дефиниране на клетъчни популации, използвана по време на анализите, е показана на Фигура 19.



Фигура 19. Стратегия за определяне на клетъчни популации за флуцитометричен анализ на спленоцити от мишки с СЮА, третиран с екстракт от шафран.

Популацията от CD19-положителните спленоцити не се повлиява от третирането с екстракта от шафран (Фигура 20, а). Степента на активиране на NK клетките при животни, инжектирани с колагеназа (група I) е по-високо в сравнение със здравите контролни животни, а третирането с различни концентрации на тествания екстракт не показва статистически достоверно намаляване на експресията на молекулата CD107 (Фигура 20, b). Беше наблюдавана тенденция към увеличаване на популацията от F4/80^{high} CD11b^{med} макрофаги, по-значително при животните третиран с 50 mg/kg екстракт (група III) в сравнение с група I (Фигура 20, c, лява графика). При популацията на неутрофилите (Ly6G^{high}CD11b^{high}) беше отчетена противоположна тенденция – статистически достоверно понижаване на популацията при животните от група III в сравнение с контролна група - I (Фигура 20, c, дясна графика).

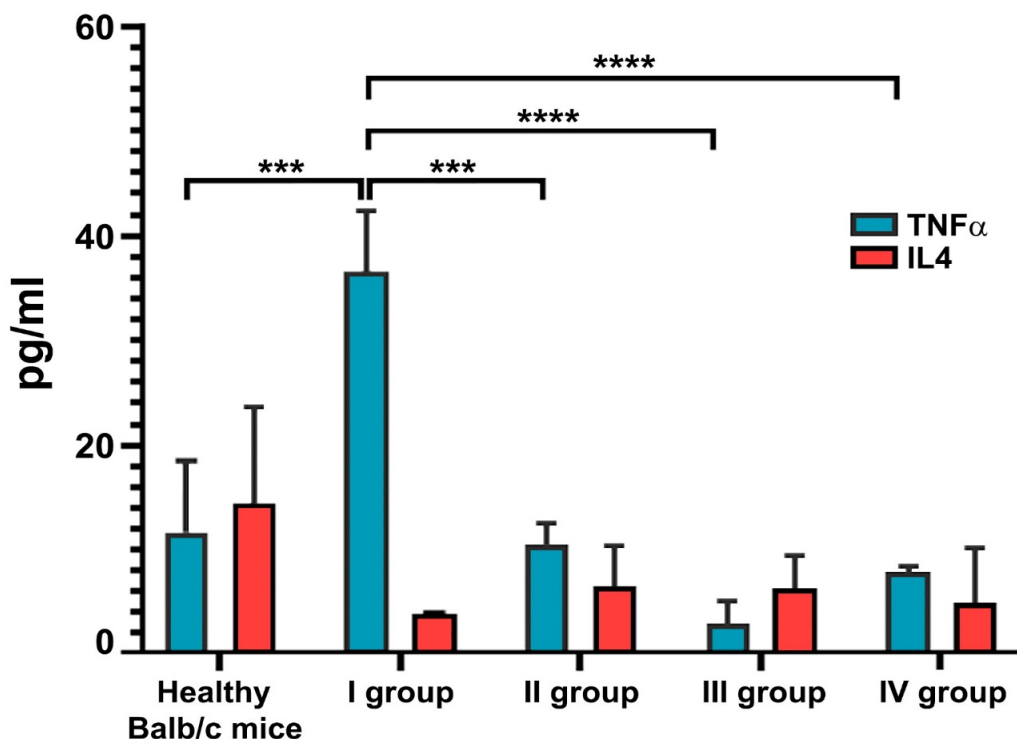


Фигура 20. Графични резултати от флоуцитометричния анализ на спленоцити на животни с колагеназа-индуциран остеоартрит подложени на терапия с екстракт от *S. sativus* (a) Б - клетки (b) НК клетки (c) Макрофаги (лява графика) и неутрофили (дясна графика) (d) Т-клетки - хелперни и цитотоксични Т-клетки (e) Активирани Т-клетки. Резултатите са представени като средно $\pm$ SD ($n = 5$). Анализирани са десет хиляди клетки от всяка проба. Данните са представителни за поне три експеримента и са анализирани чрез one-way ANOVA тест (* $p < 0,05$; ns-незначително).

Количествените анализи на популациите от Т лимфоцити (CD3⁺ Т клетки, CD4⁺ ефекторни Т клетки и CD8⁺ цитотоксични Т клетки) не показаха разлика след третиране с екстракта от шафран, въпреки че беше наблюдавана статистически незначима тенденция към намаляване на CD3CD8-позитивните Т клетки във всички изследвани групи, третирани с различни концентрации на екстракта (Фигура 20, d, десен панел). В група III (мишки, третирани с 50 mg/kg/дневно) беше отчетено понижение в процента на двойно позитивни CD25 и CD69 ефекторни Т клетки в сравнение с нетретираните животни, инжектирани с колагеназа (Фигура 20, e, десен панел).

3.2.4. Ефект на екстракта от *C. sativus* върху секрецията на про- и противовъзпалителните цитокини

През периода на терапия на животните с СІОА те бяха кръвопускани и получените серуми бяха анализирани за серумни нива на IL6, IL4 и TNF- α (Фигура 21). Инжектирането на Колагеназа тип ІА води до значително повишение на серумните нива на TNF- α в сравнение със здравите контролни животни.

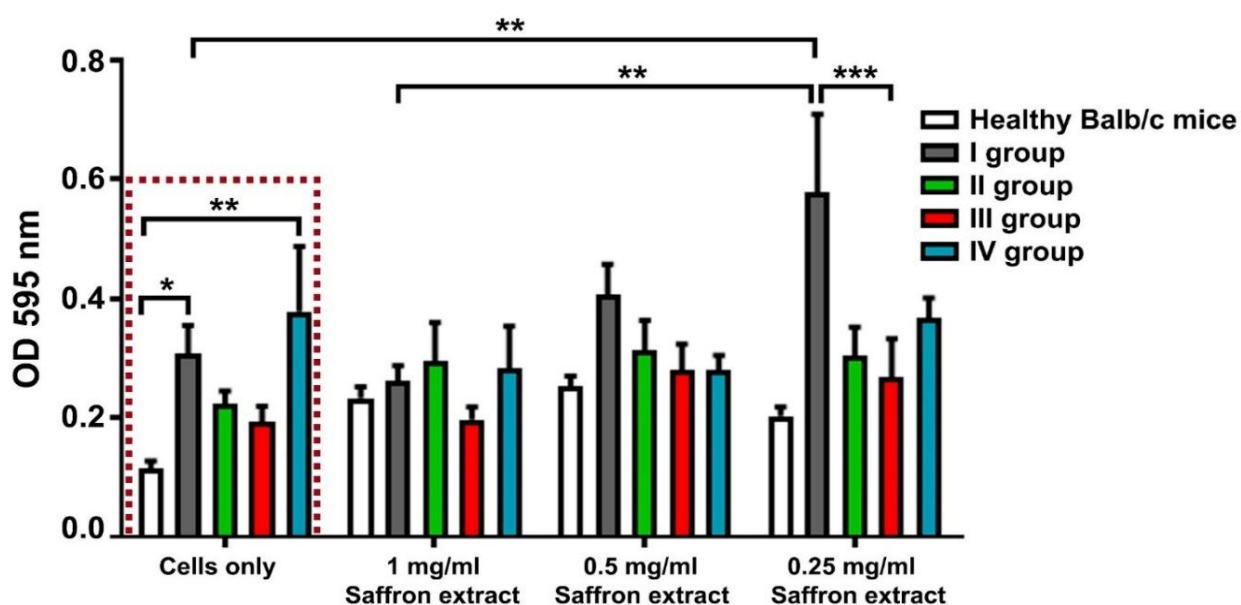


Фигура 21. Анализ на нивата на про- и противовъзпалителни цитокини в серумите на експерименталните групи животни. Нива на TNF α и IL-4; данните са от трикратни повторения на тестваните серуми и са представени като средна стойност $\pm$ SD. Анализът е извършен чрез one-way ANOVA тест, последван от теста на Bonferroni за множествено сравнение. ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$; **** $P < 0,0001$;

Анализът на серумите на експерименталните животни третиран с трите концентрации екстракт показва значително понижаване на този про-възпалителен цитокин, като най-силен ефект беше отчетен при животните третиран с 50 mg/kg екстракт (група III). В резултат от индуциране на остеоартрит, серумните нива на противовъзпалителния IL4 бяха драстично намалени във всички групи с СІОА в сравнение със здравите животни. Терапията с екстракта показва тенденция, макар и статистически недостоверна, за повишаване на нивата му в сравнение с нетретираните животни с СІОА (група I). Не бяха наблюдавани разлики в нивата на IL6 между експерименталните групи.

3.2.5. Влияние на екстракта от *C. sativus* върху клетъчната пролиферация *ex vivo*

Беше проследена *ex vivo* пролиферацията на спленоцити от животни с СІОА, третирани ежедневно в продължение на 30 дни с екстракт от шафран в концентрации 100 mg/kg (група II), 50 mg/kg (група III), 25 mg/kg (група IV) или само с PBS (група I) (Фигура 22). След изолиране на клетките те бяха култивирани в присъствието на различни концентрации от екстракта в продължение на 72 часа.



Фигура 22. Ефект на екстракта от *C. sativus* *ex vivo* и *in vitro* върху клетъчната пролиферация на спленоцити от животни с СІОА. Представителен резултат от 5 анализирани животни. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SD; за статистическият анализ е използван two-way ANOVA тест, последван от теста на Bonferroni за множествено сравнение. * < 0.05 , ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Клетките, изолирани от животни с СІОА показаха по-висока метаболитна активност в сравнение с клетките, изолирани от здрави животни. На показаната графика ясно личи тенденция за понижаване на *ex vivo* пролиферацията при групите третирани с 100 mg/kg и 50 mg/kg шафран в сравнение с нетретираните животни с остеоартрит (Фигура 22, червен правоъгълник). При *in vitro* инкубиране с екстракта от шафран се наблюдава тенденция на повишаване на пролиферацията при животните от група I (инжектирани с колагеназа, нетретирани с екстракт), обратнопропорционално на тестваните концентрации. Не беше отчетена разлика в пролиферативната активност на експерименталните групи третирани *in vivo* с екстракт от шафран.

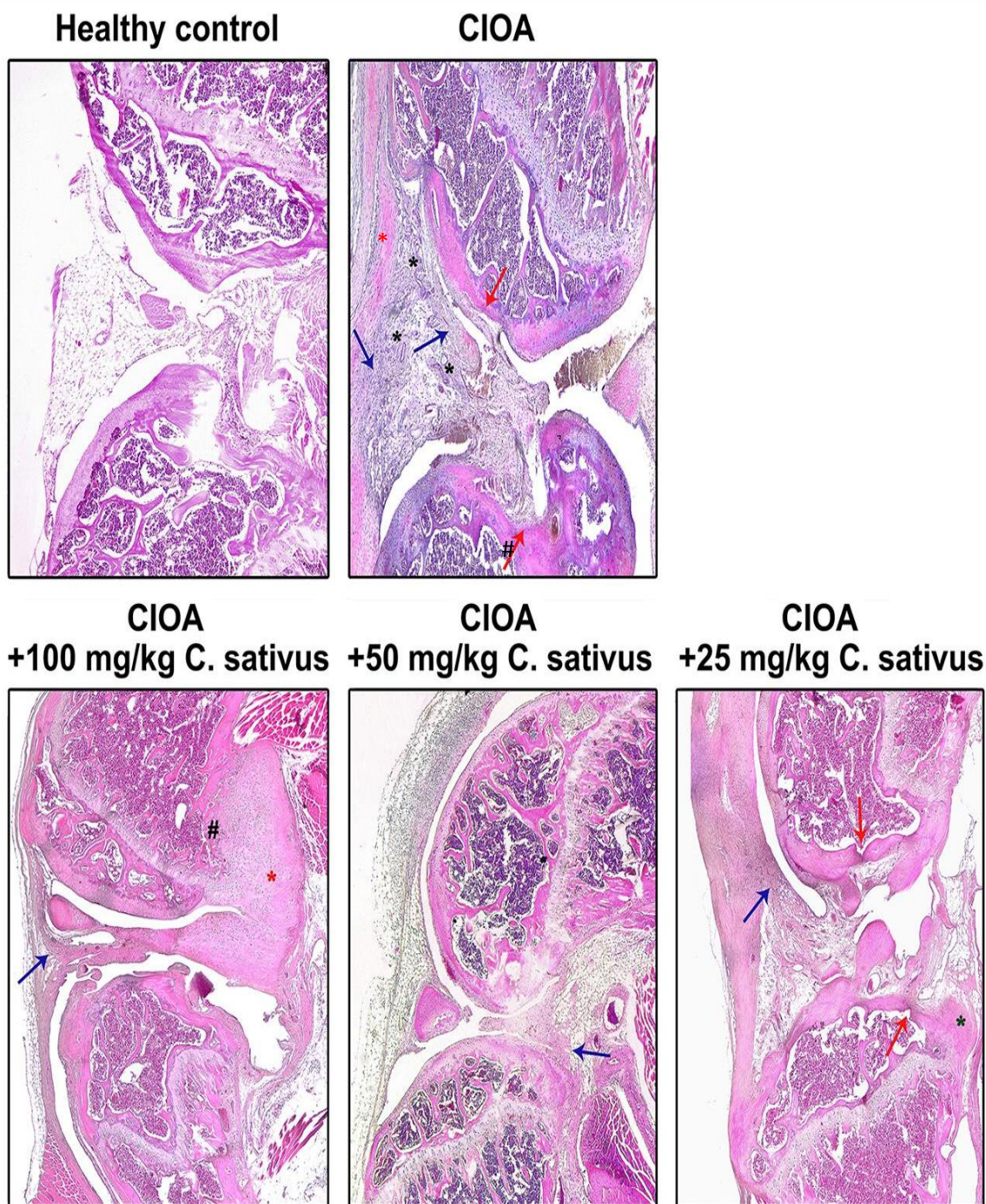
От получените резултати може да се заключи, че екстрактът от шафран не стимулира/потиска пролиферацията на клетки от здрави животни. При животните, при които е

провокирано възпаление с инжектиране на колагеназа се наблюдава тенденция за стимулиране на клетъчната пролиферация.

3.2.6. Хистологичен анализ при диференциално оцветяване с Хематоксилин и Еозин

При животните инжектирани с колагеназа много добре се забелязват вече описаните патологични изменения, характерни за СЮА - значително увеличаване на фибробластните синовиоцити, хиперплазия на синовиалната мембрана, „сливане“ на възпаления синовиум и костния мозък, инвазията в костта и хрущяла, засилена ангиогенеза (Фигура 23), разрушаване на хрущяла (червена стрелка, Фигура 23), образуването на остеофити (червена звезда, Фигура 37), локална и генерализирана костна ерозия в субхондралната кост и в кортикалното костно вещество (#, Фигура 23).

Хистологичния анализ на животните от група 2 (третирани ежедневно с екстракт от шафран в концентрация 100 mg/kg) показва добре запазена субхондриална кост. В кортикалната кост се наблюдава деструкция само в близост до остеофита, а генерализираната костна деструкция е потисната. Ограничена е локалната ерозия в определени участъци (#, Фигура 23) и в по-голямата си част хрущяла е запазен. Отчетена беше хиперплазия и хипертрофия на синовиалната мембрана и на нейната инвазия в кортикалната кост. В резултат на възпалителният процес могат да се открият пролиферирали фибробластни синовиоцити, които се сливат с костта и хрущяла. Наблюдаваният остеофит най-вероятно спада към подтипа образуван от кортикалната кост и сраства с пануса, за което се съди по местонахождението му спрямо структурата на ставата (*, Фигура 23). Виждат се и патологично образували се кръвоносни съдове (*, Фигура 23).



Фигура 23. *Хистологичен анализ на колянна става на групи от експериментални животни с индуциран остеоартрит и третиран с различни концентрации на екстракт от шафран. Оцветяване с хематоксилин-еозин; Здрава контрола, Животни с CIOA: Отчетени и отбелязани са основни патологични изменения - хиперплазия на синовиалната мембрана (→); остеофит (*); костна деструкция (#); новообразуван кръвоносен съд (*); разрушаване на хрущяла (→); Резултатите са представителни от 5 анализирани животни. Оцветяване с хематоксилин и еозин; Оригинално увеличение 5х.*

При животните от група 3 (третиран с екстракт от шафран в концентрация 50 mg/kg) се наблюдава добре запазена субхондралната кост, здрави участъци в синовиалната мембрана предимно в областите, които са по-отдалечени от костта и

хрущяла (Фигура 23). Въпреки образуването на панус и на големи остеофити, формата и здравината на хрущяла е добре запазена. Не се наблюдават деструкция и апоптиращи хондроцити, видима загуба на глюкозаминогликани или протеоглики. Генерализираната деструкция на костта е потисната, кортикалната кост е в много по-добро състояние, локалното разрушение на костта е значително намалено. Откриват се остеокласти на определени участъци от ставата, но прогресията на деструктивната им функция изглежда овладяна. Формата и здравината на хрущяла са запазени в голям процент. Отново се открива хиперплазирал и хипертрофирал синовиум. Налични са остеофити почти по цялото протежение в пространството между тибията и фемура (Фигура 23), но тяхната големина е видимо по-малка.

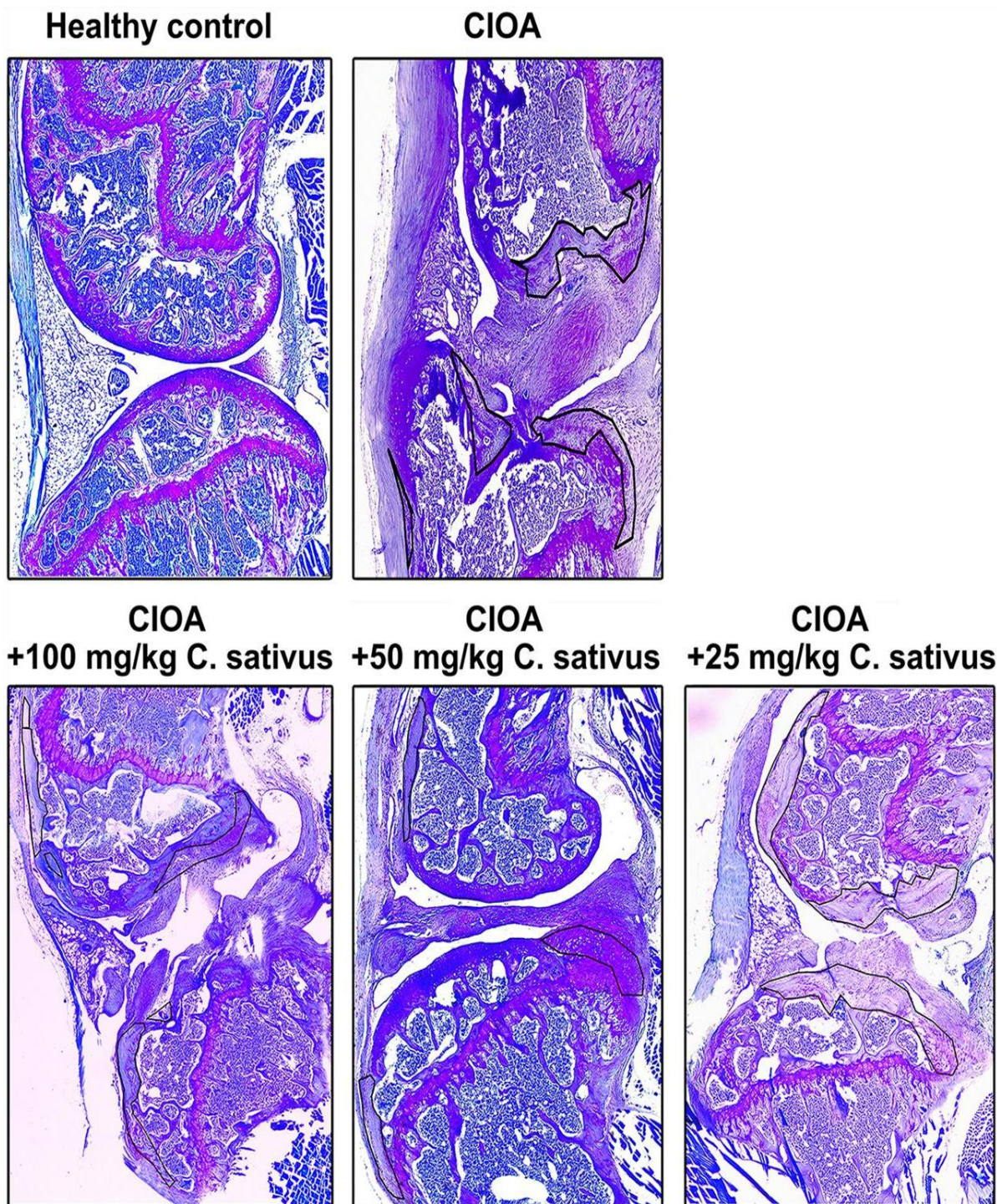
При извършения хистопатологичен анализ на животните от група 4 (третирани в продължение на 30 дни с екстракт от шафран в концентрация 25 mg/kg/ежедневно) бяха наблюдавани изменения, но целостта на хрущяла е запазена с изключение на мястото на струпване на остеокласти. Открива се хиперплазия на синовиума (Фигура 23). Вътреставното пространство е добре запазено. Наблюдава се остеофит (*, Фигура 23) с големина, сходна на този наблюдаван при група 3. Генерализираната костна ерозия е потисната подобно на по-високите дози, но за разлика от тях, при животните от тази група се откриват области на локална костна ерозия в субхондриалната кост и деструкция на хрущяла, водеща до изливане на костно вещество във вътреставното пространство (Фигура 23).

3.2.7. Хистологичен анализ при диференциално оцветяване с Толуидиново синьо

След цялостния анализ на патологичните находки беше проследена загубата на глюкозаминогликани и протеоглики при животните от всички експериментални групи чрез специфично оцветяване с толуидиново синьо. На Фигура 24 е представена силно изразената патология, която се наблюдава при BALB/с мишки с индуциран остеоартрит спрямо здравата контрола. На лице е деструкция в хрущялната тъкан и загуба на глюкозаминогликани (очертаните участъци с черни контури, Фигура 24). В по-тъмно синьо оцветяване изпъкват и остеофитните формации в ставата.

За сравнение спрямо третирани групи е представена става на здраво животно, в което добре се виждат характерните форми на хрущялите, дебелина и наситеност на оцветяване.

При анализ на патологията при група 2 (животни с индуцирано остеоартритно заболяване и третирани в продължение на 30 дни с шафранов екстракт в концентрация 100 mg/kg) е налице загуба на глюкозаминогликани и в двете кости, но в сравнително по-слаба степен спрямо нетретирания контрола (Фигура 24).



Фигура 24. Хистологичен анализ на колянна става на групи от експериментални животни с индуциран остеоартрит и третирани с различни концентрации на екстракт от шафран. Здрави животни (в ляво на горния ред); Животни с CIOA (в дясно на горния ред); Животни с CIOA третирани с 100 mg/kg екстракт от шафран (в ляво на втория ред); Животни с CIOA третирани с 50 mg/kg екстракт от шафран (в средата); Животни с CIOA третирани с 25 mg/kg екстракт от шафран (в дясно на втория ред). Отчетени и отбелязани са основни патологични изменения - деструкция на хрущял и загуба на GAG (участъците с черни контури); Резултатите са представителни от 5 анализирани животни. Оцветяване с толуидиново синьо; Оригинално увеличение 5х.

Отново, по-тъмно оцветените в синьо зони показват формираните остеофити. Характерните разрушения, откриващи се при артритните мишки от група 2 са значително намалени тук.

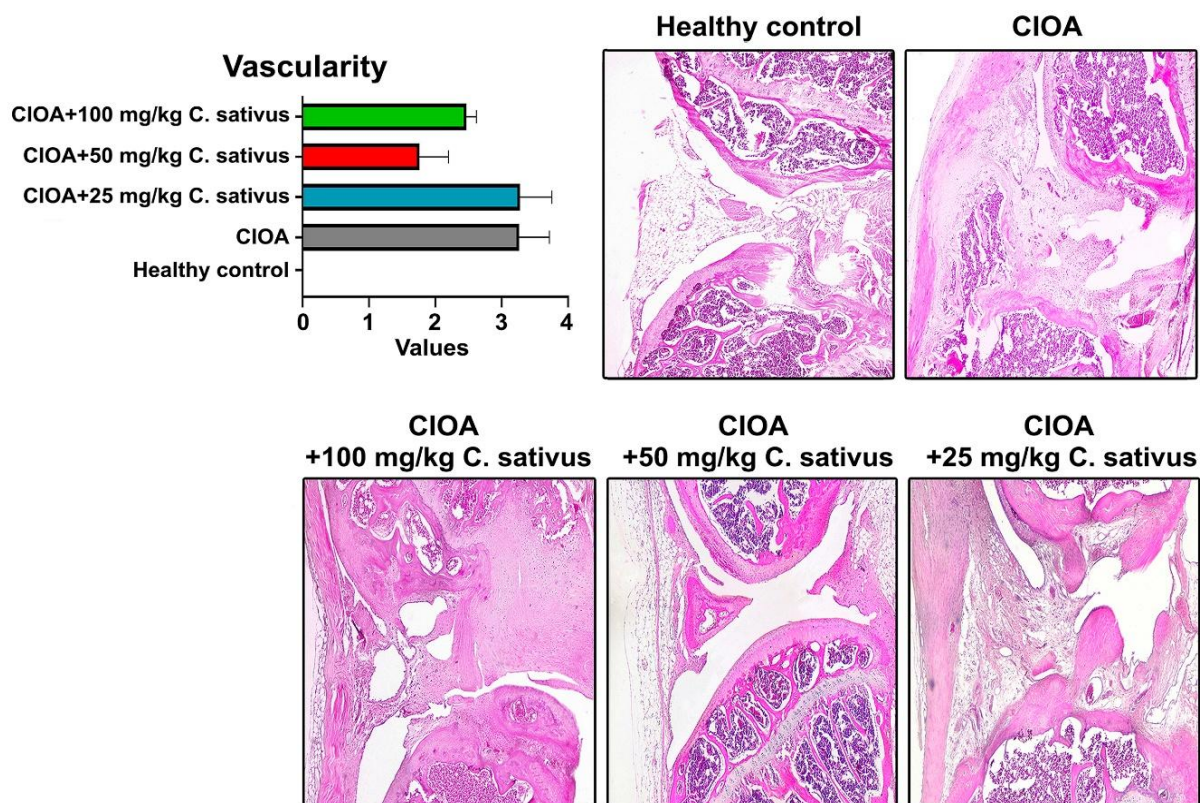
При анализа на животните от експериментална група 3 (животни с СІОА и третирани в продължение на 30 дни с екстракт от шафран в концентрация 50 mg/kg) беше наблюдавана изцяло запазена структура на хрущяла (Фигура 24). Откриват се много малки и единични участъци със загуба на глюкозаминогликани (участъците с черни контури, Фигура 24). Беше отчетено наличието на формираностеофити, но като цяло формата на ставния хрущял и цялостната структура на ставата беше много добре запазена в сравнение с контролната група животни.

При мишките от група 4 (животни с индуциран СІОА и третирани с 25 mg/kg екстракт от *Crocus sativus* в продължение на 30 дни) бяха открити големи райони на загуба на GAG (участъците с черни контури, Фигура 24). Отново са видими остеофитни формации.

От направения сравнителен анализ на хистологичните изменения в ставите на животните от всички експериментални групи може да се направи заключение, че третирането с екстракт от шафранов минзухар оказва положително въздействие върху измененията, но най-добри резултати показва терапията с 50 mg/kg шафран на ден.

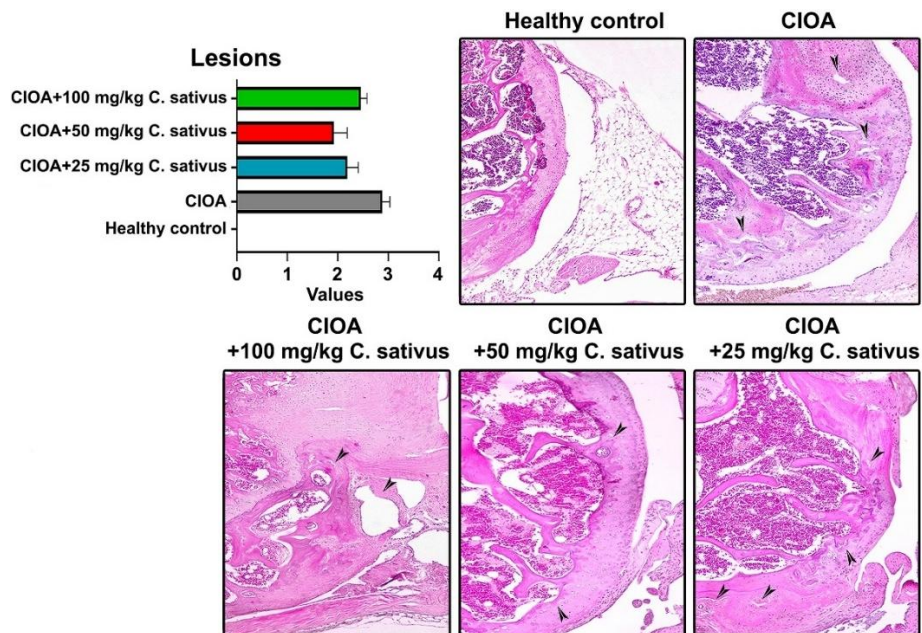
3.2.8. Анализ на ефекта от терапията с екстракт от *C. sativus* чрез системи за околичествяване на хистологичните находки

След направения анализ на хистологичните находки чрез системи за околичествяване, беше потвърдена тезата за положително въздействие на шафрана върху експерименталните животни с СІОА. За целите на това околичествяване бяха проследени четири параметъра, онагледени чрез оцветяване с толуидиново синьо и с хематоксилин и еозин. Направеният анализ обхваща всички тествани животни и препаратите, които са получени от ставите им (виж Материали и методи т.3.18.8.). Проследена беше степента на образуване на патологични кръвоносни съдове в ставата (Фигура 25), като от графиката се вижда добре изразена тенденция за понижаване на ангиогенезата при групата, третирана с 50 mg/kg шафран.



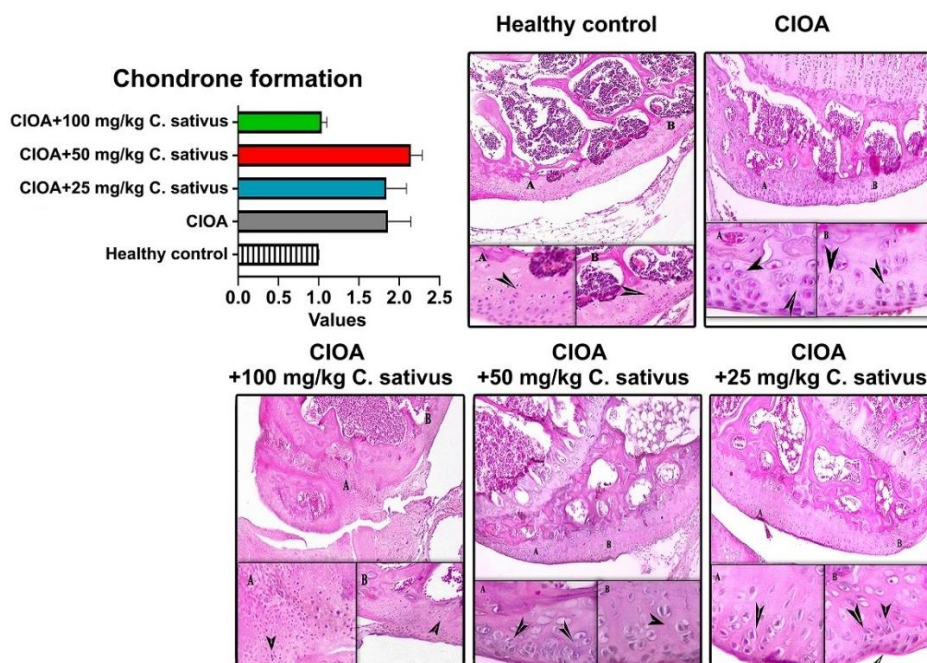
Фигура 25. Представителни хистологични срези и графика на степента на васкуларизация при мишки с CIOA след 30-дневно третиране с различни концентрации на екстракт от *C. sativus* $\pm$ SD ($n=5$); Оцветяване с хематоксилин/еозин; Микроскопската система за оценяване е описана в раздел „Материали и методи“. Увеличение 5х.

По отношение на образуването на лезии и при трите концентрации стойностите са по-ниски спрямо болната нетретирана контрола. Отново групата третирана със средната концентрация на екстракта показва най-добри резултати (Фигура 26).



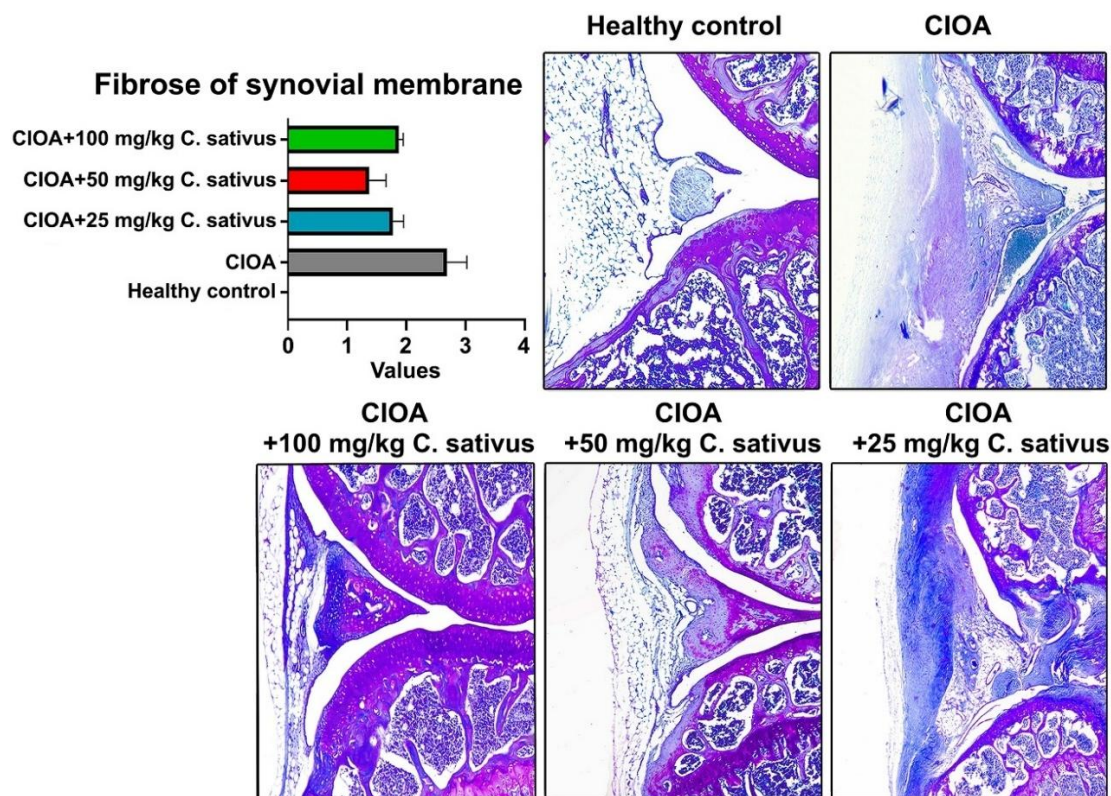
Фигура 26. Представителни хистологични срези и графика на степента на формиране на лезии при мишки с CIOA след 30-дневно третиране с с различни концентрации на екстракт от *C. Sativus* $\pm$ SD ($n = 5$); Оцветяване с хематоксилин/еозин; Микроскопската система за оценяване е описана в раздел „Материали и методи“. Увеличение 5x.

Анализът на формирането на хондроцитни струпвания в хрущяла показва, че терапията с 50 mg/kg шафран най-силно активира тази клетъчна популация и струпванията са често срещани (Фигура 27).



Фигура 27. Представителни хистологични срези и стълбовидни графики на степента на струпването на хондроцити при мишки с CIOA след 30-дневно третиране с с различни концентрации на екстракт от *C. sativus* $\pm$ SD ($n = 5$); Оцветяване с хематоксилин/еозин; Микроскопската система за оценяване е описана в раздел „Материали и методи“. Микроскопско увеличение на горния ред 5x и 20x на малките две снимки.

Последният параметър, който беше оценен е фиброзата в ставата, като отново при 50 mg/kg шафран беше наблюдавано частично нормализиране в структурата на синовиалната мембрана, което показва протективния ефект от прилаганата терапия (Фигура 28).



Фигура 28. Представителни хистологични срези и стълбовидни графики на състоянието на фиброзата на синовиалната мембрана при мишки с CIOA след 30-дневно третиране с различни концентрации на екстракт от *C. sativus* $\pm$ SD ($n = 5$); Оцветяване с толудиново синьо; Микроскопската система за оценяване е описана в раздел „Материали и методи“. Микроскопско увеличение 5x.

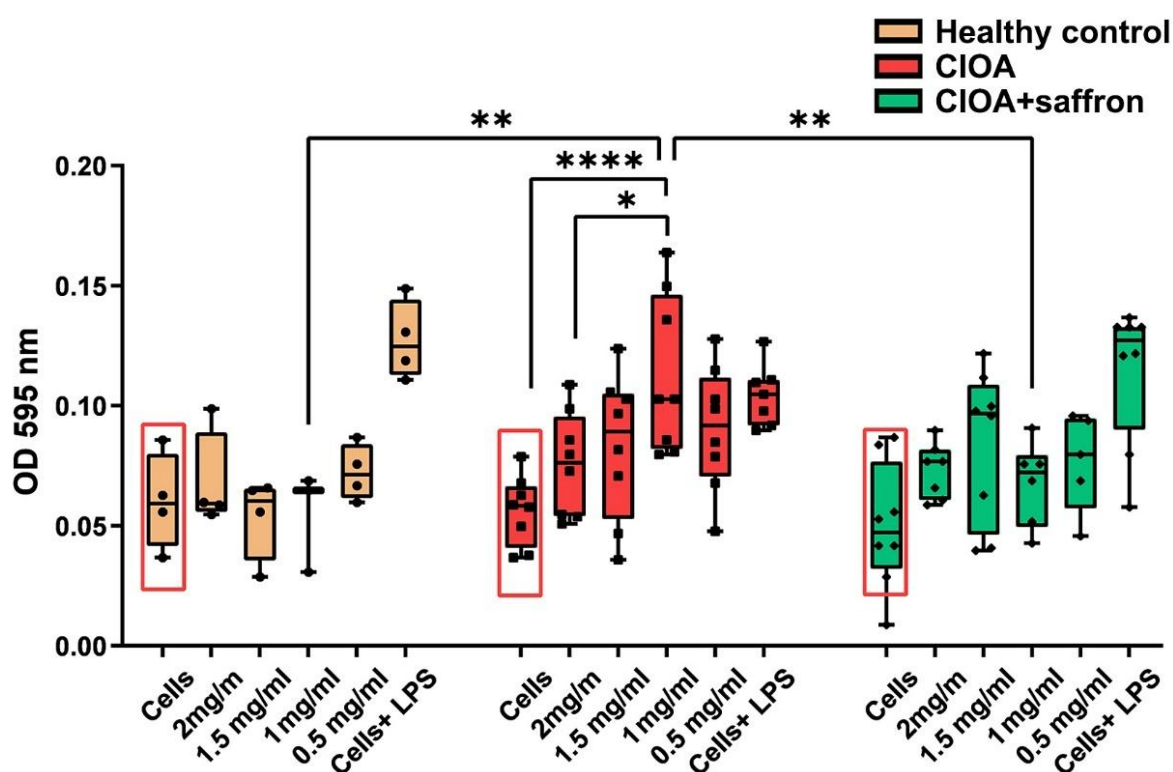
Като обобщение и на база на получените резултати може да се заключи, че терапията с 50 mg/kg екстракт от *Crocus sativus* показва най-ефективно действие в моделирането на патологичните изменения в засегнатата става.

3.3. Терапевтичен ефект на екстракта от *Crocus Sativus* при избрана концентрация 50 mg/kg

За провеждането на тези анализи, BALB/c мишки бяха разпределени на случаен принцип в три експериментални групи. В две от групите беше индуциран остеоартрит по описания вече подход. Едната група животни с CIOA бяха третирани с 50 mg/kg екстракт от *Crocus sativus*, втората група животни с остеоартрит бяха третирани с PBS и трета контролна група, включваща здрави животни. Третирането беше извършено по вече установената схема в продължение на 30 дни.

3.3.1. Ефект на терапия с 50 mg/kg *Crocus sativus* върху пролиферацията на миши спленоцити

Оценката на ефекта на тестваната субстанция беше анализиран чрез *ex vivo* експерименти върху клетъчната пролиферация и преживяемост на спленоцити, изолирани от експерименталните животни след 72-часова инкубация с различни концентрации на екстракта. Не бяха отчетени разлики в пролиферативната активност *ex vivo* на спленоцитите в нито една от тестовите групи без допълнителна стимулация (Фигура 29, червени правоъгълници). Инкубирането на спленоцити от здрави Balb/c мишки с различни концентрации на екстракта не повлиява клетъчната пролиферация в сравнение с положителната контрола - LPS. За разлика от тях, спленоцитите, изолирани от животни с CIOA показват дозозависим отговор при стимулиране с екстракт от шафран в сравнение с нетретираните клетки от същата група. Не бяха установени значими разлики между клетките от групата с CIOA, инкубирани *ex vivo* с екстракт от шафран в сравнение с клетките от животни *in vivo* третирани с екстракта.

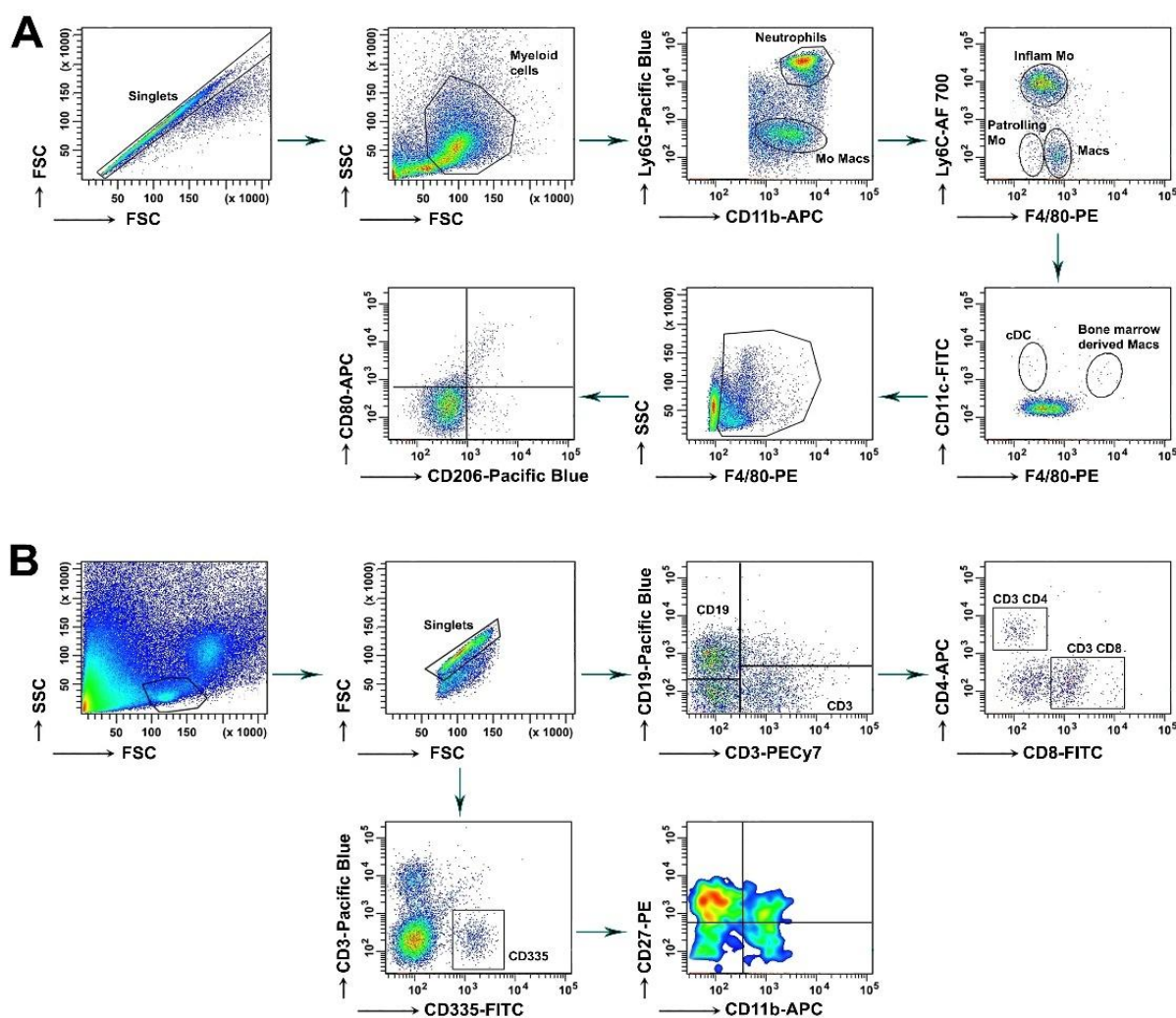


Фигура 29. *Ex vivo* изследване на пролиферацията на спленоцити, култивирани в присъствието на различни концентрации от шафранов екстракт. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 5$). Данните бяха анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от теста на Tukey за множествено сравнение. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.0001$.

Наблюдавахме значително повишена клетъчна пролиферация при СЮА мишки, култивирани *ex vivo* с 1 mg/ml екстракт от шафран в сравнение с клетките от здрави Balb/c мишки и групата СЮА + 50 mg/kg шафран, култивирани със същата концентрация на екстракта (Фигура 29). Не бяха отчетени значими разлики след 48 часа инкубация с тествания екстракт за всички групи (данните не са показани).

3.3.2. FACS анализ на синовиум и костен мозък на животни с индуциран остеоартрит и третирани с 50 mg/kg екстракт от шафран

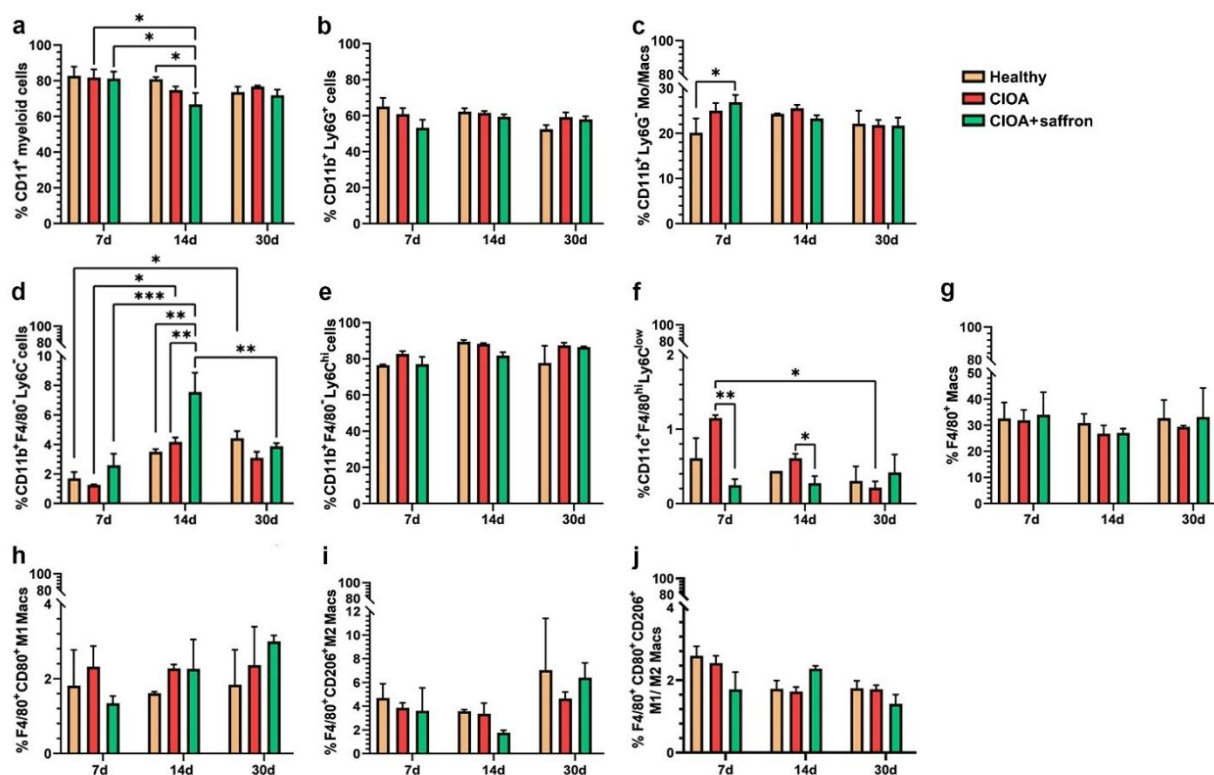
Беше извършен FACS анализ на ефекта от терапията с 50 mg/kg екстракт от шафран върху популациите на имунните клетки в костния мозък и синовиум през трите етапа на развитие на СЮА. На Фигура 30 е представена гейтинг стратегията за анализ на клетъчна суспензия от костен мозък и синовиум.



Фигура 30 Стратегия за определяне на клетъчни популации за флуоцитометричен анализ на костен мозък и синовиум на миелоидни (A) и лимфоцитни (B) клетки от мишки с СЮА и третирани с екстракт от шафран.

В костния мозък бяха проследени миелоидни клетъчни субпопулации и основни лимфоцитни популации както следва: $CD11b^+F4/80^-Ly6C^{hi}$ и $CD11b^+F4/80^-Ly6C^{lo}$ моноцити; костно-мозъчни макрофагалини субпопулации ($F4/80^{hi}CD11c^+Ly6C^{lo}$), макрофаги M1 ($F4/80^{hi}CD80^+$), M2 ($F4/80^{hi}CD206^+$) и M1/M2 ($F4/80^{hi}CD80^+CD206^+$), неутрофили ($CD11b^+Ly6G^+F4/80^-$).

На 14-и ден беше установено намаляване на популацията на миелоидните клетки в групата с CIOA+50 mg/kg шафран (Фигура 31a). Не бяха отчетени значителни промени в популацията на неутрофили (Фигура 31b) и $CD11b^+F4/80^-Ly6C^{hi}$ моноцитите (Фигура 31e).

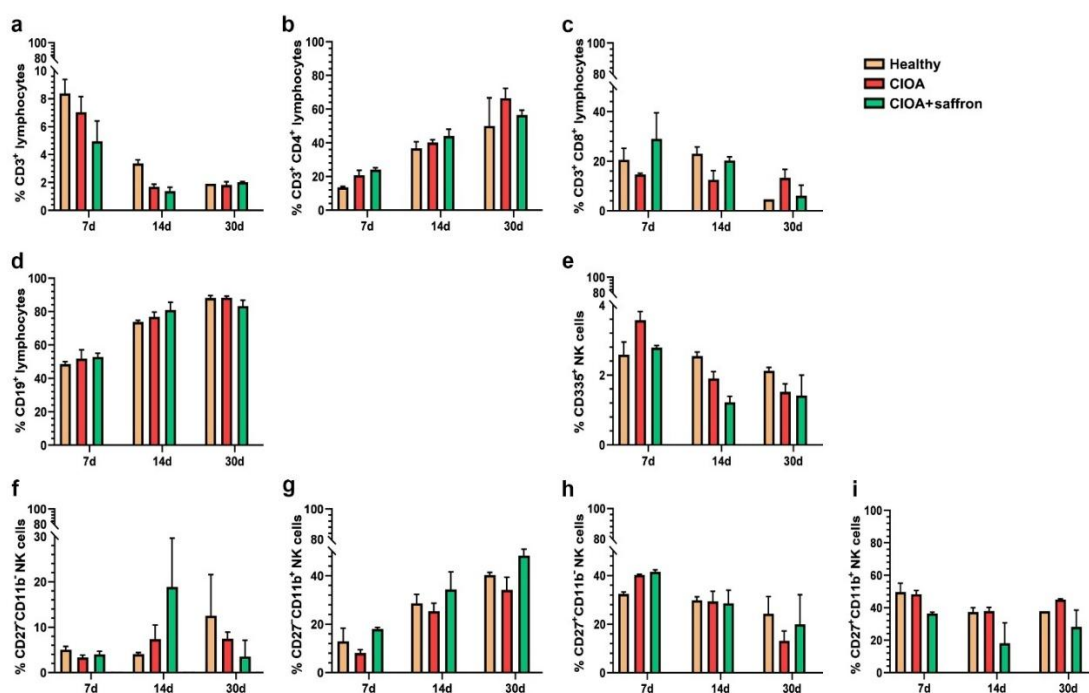


Фигура 31. Фенотипизиране на костно-мозъчни клетки от експериментални групи животни с индуциран остеоартрит на 7-ми, 14-ти и 30-ти ден след индукцията и третиране с екстракт от шафран (a) миелоидни клетки; (b) $CD11b^+Ly6G^+$; (c) $CD11b^+Ly6G^+$; (d) $CD11b^+F4/80^-Ly6C^{hi}$; (e) $CD11b^+F4/80^-Ly6C^{hi}$; (f) $CD11b^+F4/80^{hi}Ly6C^{low}$; (g) $F4/80^+$ Мф; (h) $F4/80^+CD80^+$ M1 Мф; (i) $F4/80^+CD206^+$ M2 Мф; (j) $F4/80^+CD80^+CD206^+$ M1/ M2 Мф; Данните са представени като средна стойност $\pm SD$ ($n = 5$). Данните бяха анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от теста на Tukey за множествено сравнение. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; * $P < 0,0005$; **** $P < 0,0001$.**

Най-забележимата промяна беше наблюдавана в популацията на така наречените патрулиращи моноцити ($CD11b^+F4/80^-Ly6C^{lo}$). Групата животни третиране с CIOA+50 mg/kg шафран показва значително повишени нива на тази клетъчна популация в сравнение с контролните групи след 14-дневна терапия (Фигура 31d). В хроничната фаза на CIOA (30 ден) същата популация моноцити беше намалена до нива, сравними със здравите контроли.

Значително повишени нива на $CD11c^{+} F4/80^{hi} Ly6C^{low}$ макрофагите бяха отчетени при групата с CIOA 7 дни след индуциране на артрит. До края на периода на изследване тази клетъчна популация беше намалена до нивата, отчетени при здравата контролна група. В същото време, броят на тези макрофаги при групата CIOA+50 mg/kg шафран остана много нисък през целия период на третиране (Фигура 31f). Не бяха установени значителни разлики между групите по отношение на популациите на M1, M2 и M1/M2 макрофагите (Фигура 31h, i, j).

Анализът на лимфоцитните популации в костния мозък на експерименталните животни не показва значителни разлики сред субпопулациите на Т-клетките (Фигура 32a-c) и В-клетките (Фигура 32d) след терапията с екстракта от шафран. Прилагането на изследвания екстракт също така не повлиява значително процента на различните субпопулации на NK клетките, въпреки че бяха отчетени някои минимални изменения (Фигура 32e-i).

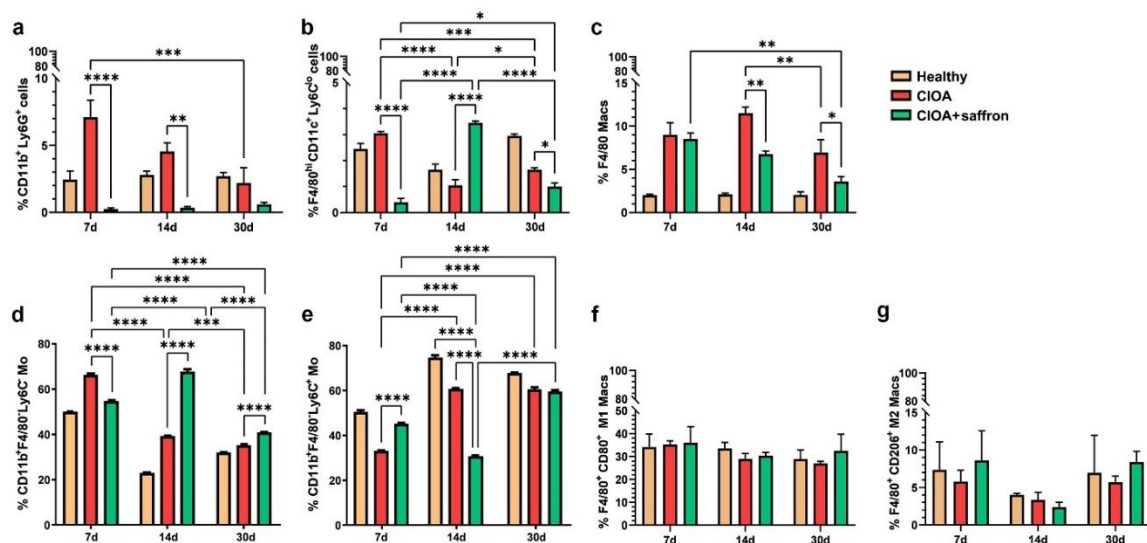


Фигура 32 Фенотипизиране на костно-мозъчни клетки от експериментални групи животни с индуциран остеоартрит на 7-ми, 14-ти и 30-ти ден след индукцията и третиране с екстракт от шафран. Обобщени данни: (a) Т-клетки; (b) Т-хелперни клетки; (c) Т-цитотоксични клетки; (d) В-лимфоцити; (e) NK клетки; (f) $CD27^{-}CD11b^{-}$ NK клетки; (g) $CD27^{-}CD11b^{+}$ NK клетки; (h) $CD27^{+}CD11b^{-}$ NK клетки; (i) $CD27^{+}CD11b^{+}$ NK клетки; Данните са представени като средна стойност $\pm SD$ ($n = 5$). Данните бяха анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от теста на Tukey за множествено сравнение.

Фенотипизирането на синовиални клетки изолирани от животни и третиране с 50 mg/kg екстракт от шафран показва значително намаляване на популацията на неутрофилите ($CD11b^{+} Ly6G^{+}$) за целия период на терапия (Фигура 33a). Популацията на $F4/80^{hi}CD11c^{+}Ly6C^{low}$

клетките при третираните с шафран мишки беше много ниска на 7-и ден в сравнение с контролните групи, но в активната фаза на ОА беше наблюдавано значително увеличение на процента на същите клетки, които отново намаляват в края на периода на наблюдението (Фигура 33b). Популацията на макрофагите (F4/80) беше увеличена и в двете СІОА групи скоро след началото на заболяването, но на 14-и и 30-и ден беше открито значително намаляване на процента на тези клетки в ставите на животните от група СІОА+50 mg/kg шафран в сравнение с нелекуваните контролни групи СІОА (Фигура 33c).

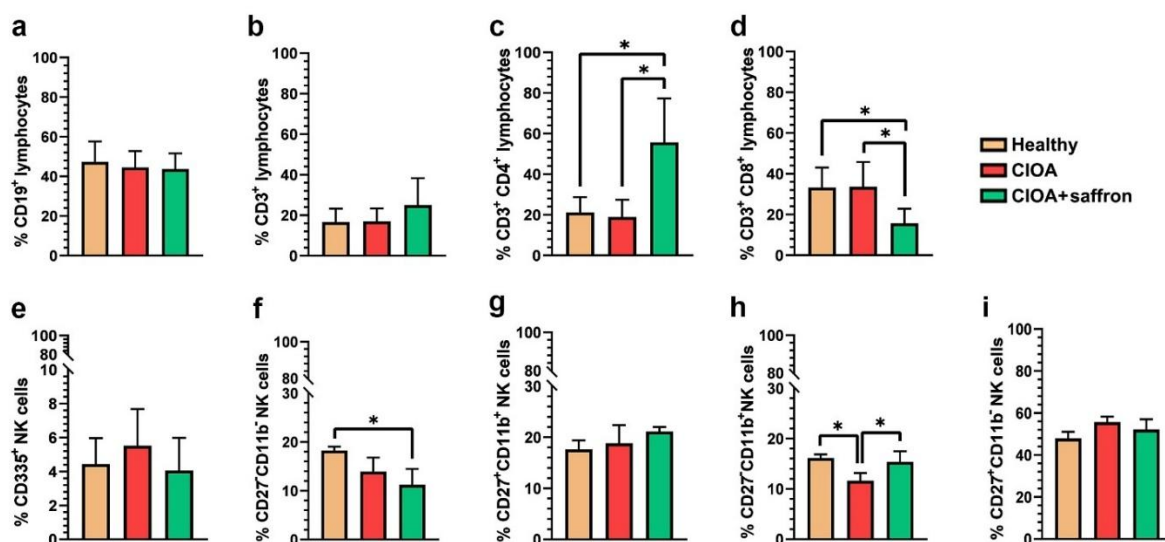
При групата СІОА+50 mg/kg шафран беше наблюдавано увеличение на процента на $CD11b^+ F4/80^- Ly6C^{low}$ моноцитите и намаление на популацията на $CD11b^+ F4/80^- Ly6C^{hi}$ в активната фаза на развитие на остеоартрита. Противоположни резултати бяха установени в групата с СІОА в активната фаза на заболяването (Фигура 33d, e). Не бяха измерени статистически значими разлики между групите по отношение на M1 и M2 макрофагите (Фигура 33f, g).



Фигура 33 Фенотипизиране на синовиални клетки от експериментални групи животни с индуциран остеоартрит на 7-ми, 14-ти и 30-ти ден след индукцията и третиран с екстракт от шафран. Обобщени данни: (a) $CD11b^+Ly6G^+$; (b) $F4/80^{hi}CD11c^+Ly6C^{low}$; (c) F4/80 МФ-; (d) $CD11b^+F4/80^-Ly6C^- Mo$; (e) $CD11b^+F4/80^-Ly6C^+ Mo$; (f) $F4/80^+ CD80^+ M1 M\phi s$; (g) $F4/80^+ CD206^+ M2 M\phi$; Данните са представени като средна стойност $\pm SD$ ($n = 5$). Данните бяха анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от теста на Tukey за множествено сравнение.. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$; **** $P < 0,0001$.

Не отчетохме значими разлики между популациите на CD19 и CD3 лимфоцитите в синовиума на животните от различните групи (Фигура 34a, b). Значително увеличение на $CD4^+$ Т клетките и намаление на популация на цитотоксичите $CD8^+$ Т клетките беше наблюдавана в група СІОА+50 mg/kg шафран в сравнение с контролите (Фигура 34c, d). Третирането на мишки с СІОА с екстракт от шафран не повлиява процента на $CD335^+$ NK клетките (Фигура 34e), но

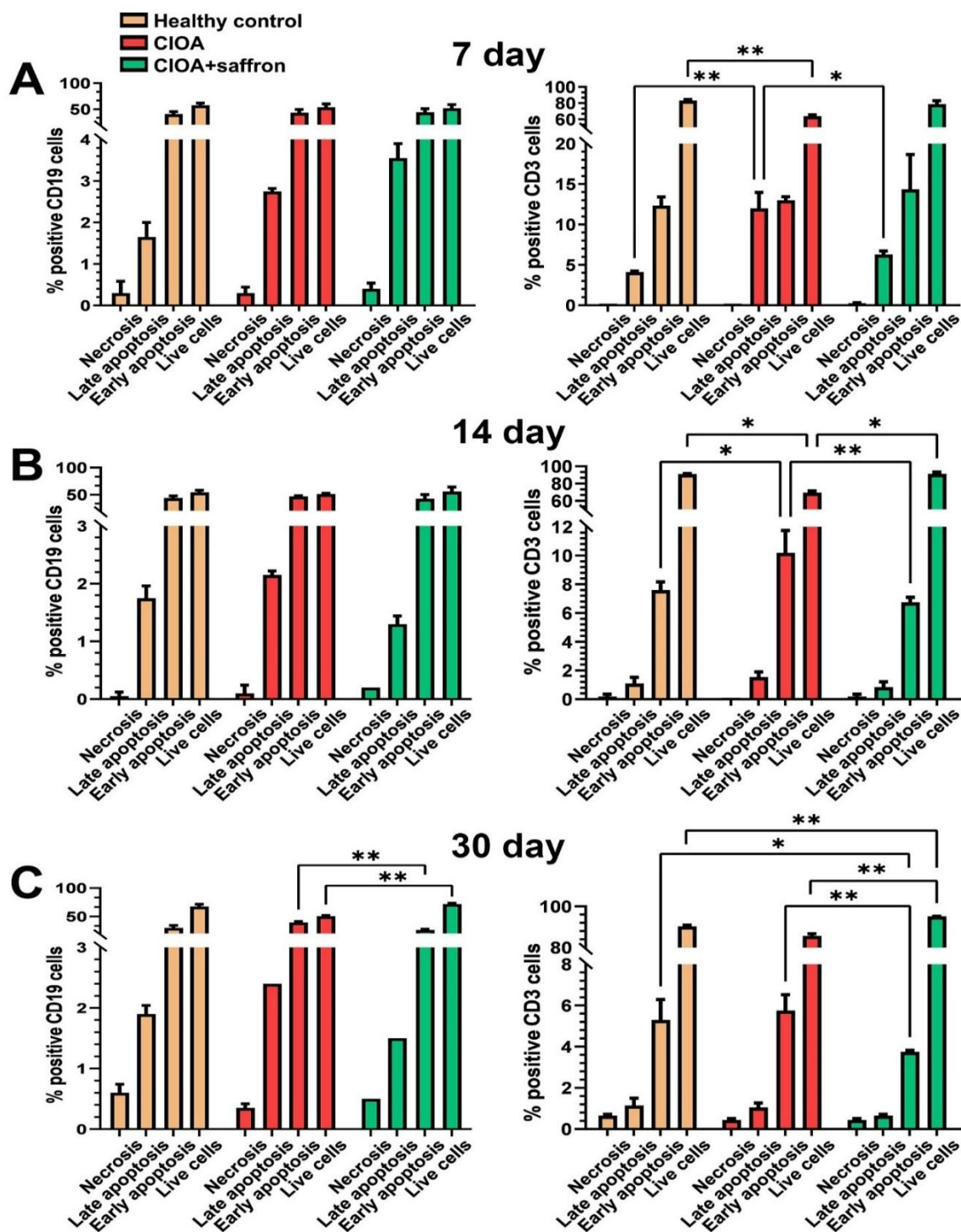
анализът на субпопулациите показва увеличаване на CD27⁻ CD11b⁺ зрелите NK клетки и намаляване на CD27⁻ CD11b⁻ недиференцираните NK клетки, в сравнение с контролните групи (Фигура 34f, h). Не бяха открити значителни промени и в другите субпопулации на NK клетките (Фигура 34g, i).



Фигура 34. Фенотипизиране на синовиални клетки от експериментални групи животни с индуциран остеоартрит на 7-ми, 14-ти и 30-ти ден след индукцията и третиране с екстракт от шафран. Обобщени данни: (a) В-лимфоцити; (b) Т-клетки; (c) Т-хелперни клетки; (d) Т - цитотоксични клетки; (e) NK -клетки; (f) CD27⁻CD11b⁻ NK клетки; (g) CD27⁺CD11b⁺ NK клетки; (h) CD27⁻CD11b⁺ NK клетки; (i) CD27⁺CD11b⁻ NK клетки; Данните са представени като средна стойност ±SD (n = 5). Данните бяха анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от теста на Tukey за множествено сравнение. *P < 0,05.

3.3.3. Апоптоза

Беше тествано въздействието на терапията върху степента на апоптоза на спленоцити, изолирани от животни от трите експериментални групи. То беше проследено през трите етапа на развитие на заболяването. Седем дни след индуцирането на остеоартрит беше наблюдавано незначително увеличение на късната апоптоза на В клетките и при двете групи животни с CIOA, третирани или нетретирани с шафран, в сравнение със здравите контроли (Фигура 35А, ляв панел). В същото време, при нетретирани животни с CIOA бяха отчетени повишени нива на късна апоптоза и намаляване преживяемостта на Т-клетките в сравнение със здравите контроли, докато третирането с шафран поддържа нива, сравними с тези при здравите мишки (Фигура 35А десен панел).



Фигура 35. Анализ на апатозата на В и Т-лимфоцити изолирани от слезки на експериментални животни с индуциран остеоартрит и третирани с екстракт от шафран. (А) анализ на 7-ми ден след инжектиране на колагеназа; (В) анализ на 14-ти ден след инжектиране на колагеназа; (С) анализ на 30-ти ден след инжектиране на колагеназа; Данните са представени като средна стойност $\pm$ SD ($n = 5$). Данните бяха анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от теста на Tukey за множество сравнение. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

На 14-ия ден след индуциране на CIOA в групата с CIOA+50 mg/kg шафран бяха установени значително по-ниски нива на ранна апоптоза и подобрене на общата преживяемост

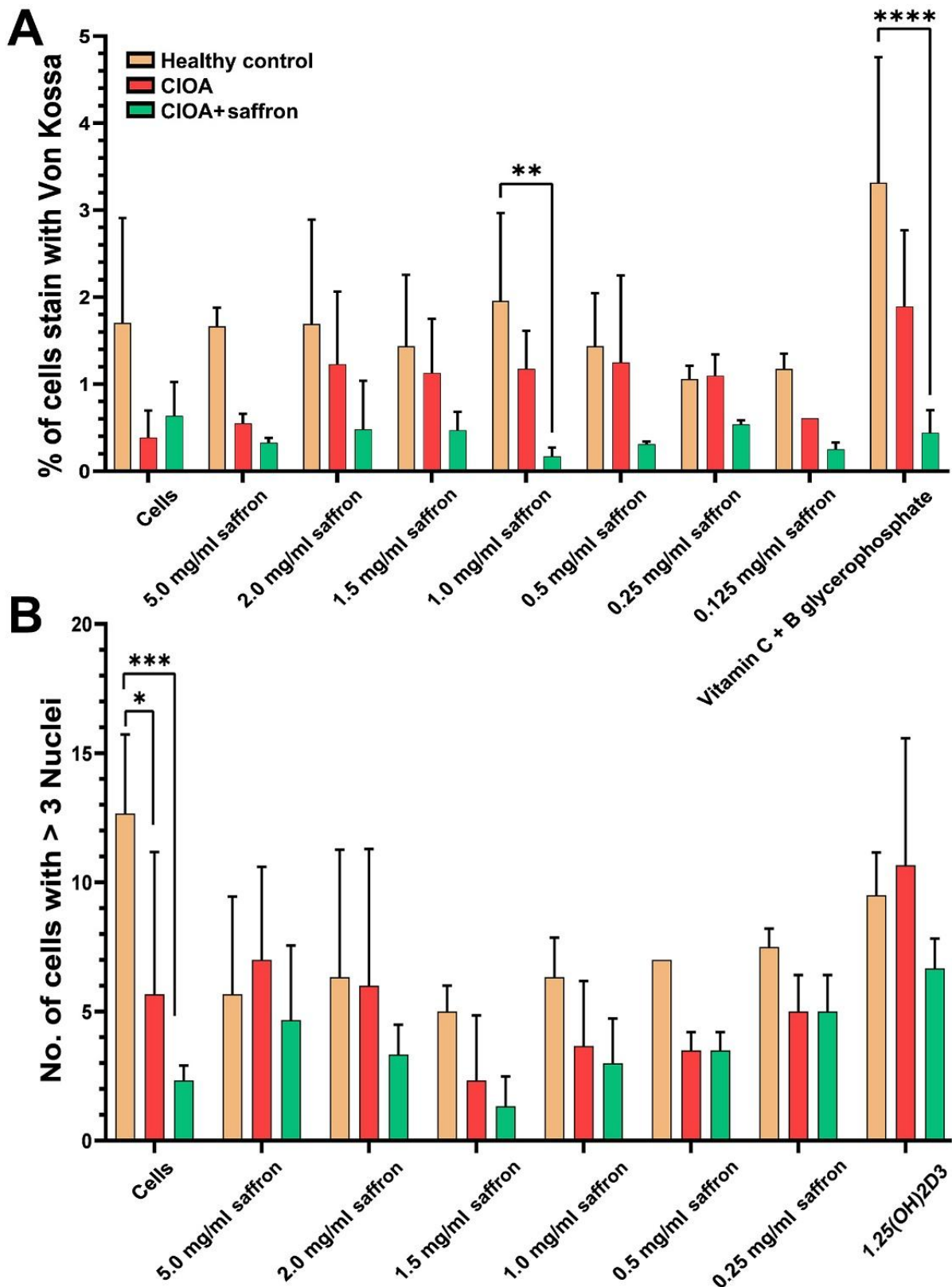
на Т-клетките, в сравнение с нелекуваните мишки с СІОА (Фигура 35В, десен панел), не бяха отчетени значителни промени в В-клетките (Фигура 35В, ляв панел).

В хроничната фаза от развитието на остеоартрита (30-ия ден) получените данни потвърждават защитния ефект на екстракта от шафран, като възпроизвеждат резултата от намалената ранна апоптоза и подобрената обща преживяемост на Т-клетките (Фигура 35С, десен панел). Тук беше установено статистически значимо намаляване на ранната апоптоза и повишена преживяемост на В клетките при групите с шафран, в сравнение с нетретираните мишки с СІОА (Фигура 35С, ляв панел).

3.3.4. Анализ на ефекта на екстракта от *C. sativus* върху остеокластната и остеобластната диференциация *in vitro*

Ex vivo и *in vitro* ефектът на екстракта от шафран върху патологичните процеси на ставно ремоделиране беше тестван с помощта на клетки от костен мозък на опитни животни. *In vivo* третирането на експериментални мишки с СІОА с екстракт от шафран не повлиява остеобластната диференциация, получена в резултат на *ex vivo* култивиране на клетки от костен мозък, в сравнение с контролната нетретирана група с СІОА (Фигура 36А). Допълнителното *in vitro* стимулиране на клетки от костен мозък с различни концентрации на екстракт от шафран увеличава без статистическа достоверност процента на клетките с по-високи нива на калцификация в групата мишки с СІОА в сравнение с групата СІОА+50 mg/kg шафран (Фигура 36А). Изненадващо, третирането *in vitro* не повлиява клетъчната диференциация при групата, третирана *in vivo* със същия екстракт.

За да се оцени анти-остеокластогенният потенциал на екстракта от шафран беше извършена *in vitro* диференциация на остеокласти, индуцирана от 1, 25 ди-хидрокси-витамин D3. Клетките от костен мозък бяха инкубирани в присъствието на различни концентрации на тествания екстракт (виж материали и методи). Контролни клетки бяха инкубирани само в среда за да се проследи ефектът на *in vivo* третирането. Екстрактът от шафран значително инхибира *in vivo* диференциацията на остеокластоподобните клетки до многоядрени клетки без допълнително *in vitro* третиране (Фигура 36В). Терапията с шафран *ex vivo* не повлиява значително клетките от различните групи животни, въпреки че групата СІОА+50 mg/kg шафран поддържа незначително по-ниски нива от контролите.

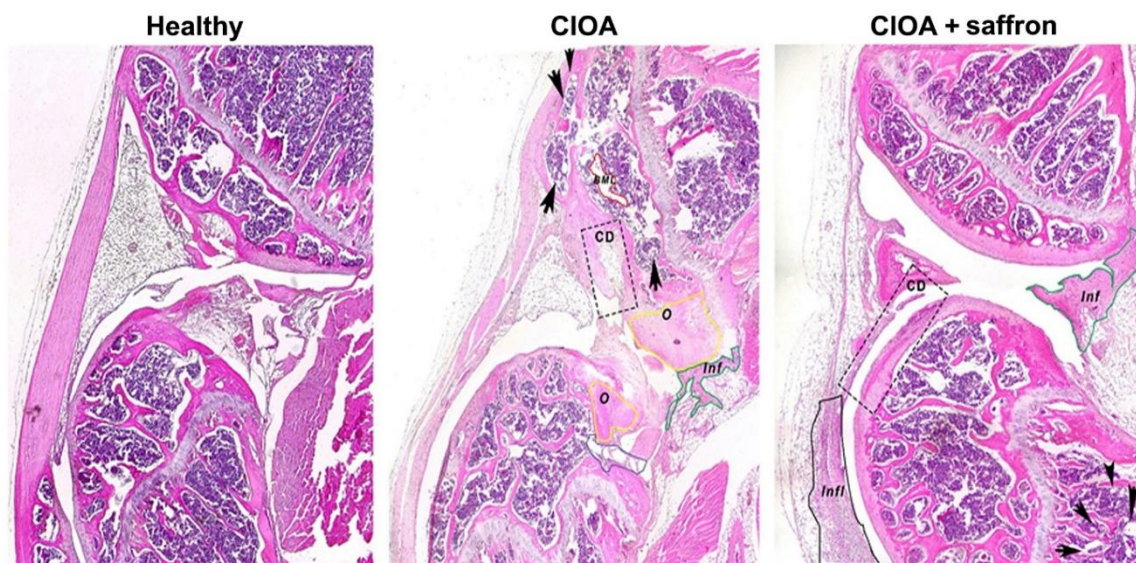


Фигура 36. Анализ на *ex vivo* диференциацията на клетки от костен мозък в остеобласти (A) и остеокласти (B) в присъствието на различни концентрации на екстракт от шафран. Графика A представя процента на клетките, оцветени с Von Kossa и определени като остеобласти. Графика B представя броя на многоядрените клетки, определени като остеокласти. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SD ($n=5$) и са анализирани чрез two-way ANOVA, последван от тест за множествено сравнение на Tukey. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

3.3.5. Хистологичен анализ на стави на животни с CIOA за определяне ефекта от терапията с 50 mg/kg *Crocus sativus* чрез оцветяване с хематоксилин и еозин

Беше извършена подробна хистологична оценка на стави на животни от трите експериментални групи. Бяха извършени специфични хистохимични оцветявания за оценка на общите хистопатологични промени, степента на загуба на протеогликани и гликозаминогликани и степента на калциране на костите.

Ставите от здрави нетретирани контролни животни показаха нормална синовиална тъкан (Sy), без очевидни деформации в бедрената кост и без отклонения в структурата на костния мозък (Фигура 37, ляво). За разлика от тях, групата животни с CIOA показва значителни патологични изменения, включително изразено синовиално възпаление, характеризиращо се с частично удебеляване на синовиалната мембрана с приблизително седем слоя синовиоцити (Фигура 37, в средата).



Фигура 37. Хистологичен анализ на колянна става на групи от експериментални животни с индуциран остеоартрит; в ляво – Здрави нетретирани животни; в средата – Животни с CIOA; в дясно– Животни с CIOA и третирани с 50 mg/kg шафран; Отчетени и отбелязани са основни патологични изменения – образувани остеофити (O), разрушаване на хрущяла (CD), частична липса на костно-мозъчно вещество (BML) и адипоцитни промени (стрелки); отлагане на фиброзна тъкан (Infl), клетъчна инфилтрация (Infl). Резултатите са представителни от 5 анализирани животни. Оцветяване с хематоксилин и еозин; Оригиналното увеличение x40.

Беше наблюдавано ясно изразено образуване на остеофити с голям остеофит на ръба на бедрената кост и друг между тибията и бедрената кост в областта на менискуса (O). Видима е и тежка деградация на хрущяла (CD), както и деформация на архитектурата на тибията, засягаща както хрущяла, така и субхондралната кост. Беше отчетена изразена хипертрофия на растежната

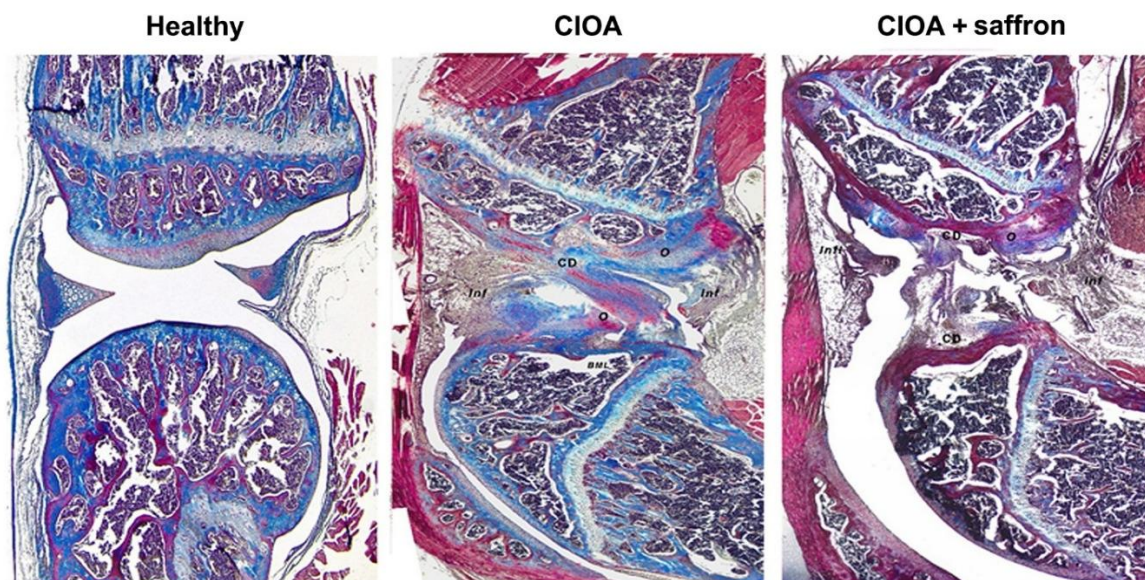
плочка и структурна дезорганизация, както и промени в субхондралния костен мозък, включително частична загуба на костен мозък (BML) и адипоцитна трансформация (стрелки).

При групата мишки с CIOA и третирани с шафран, ставите показаха леко синовиално възпаление с отлагане на фиброзна тъкан в близост до бедрения хрущял (Infl) и локализирана инфилтрация на възпалителни клетки в дисталния край на тибията (Inf) (Фигура 37, дясно). Адипоцитни промени са налице и в костния мозък (стрелки). Въпреки, че се наблюдаваше увреждане на хрущяла в тибията (CD), тежестта му беше значително намалена в сравнение с нетретиранията група с CIOA, което предполага защитен ефект на лечението с шафран.

3.3.6. Хистологичен анализ на стави на животни с CIOA за определяне ефекта от терапията с 50 mg/kg *Crocus sativus* чрез специфично оцветяване по метода на Масон Трихром

Оцветяването по метода на Масон Трихром е използвано за оценка на структурната цялост, фиброзата и ремоделирането на екстрацелуларния матрикс (ECM) в ставния хрущял и околната ставна тъкан при здрави мишки и мишки с CIOA, с или без третиране с *C. sativus*. Ставният хрущял на здравата група изглеждаше гладък и добре структуриран, с равномерно оцветяване на колагена (синьо) и минимално нарушаване на ECM (Фигура 38, ляво). Субхондралната кост и синовиалната тъкан бяха без изменения и без признаци на фиброза или възпалителна инфилтрация.

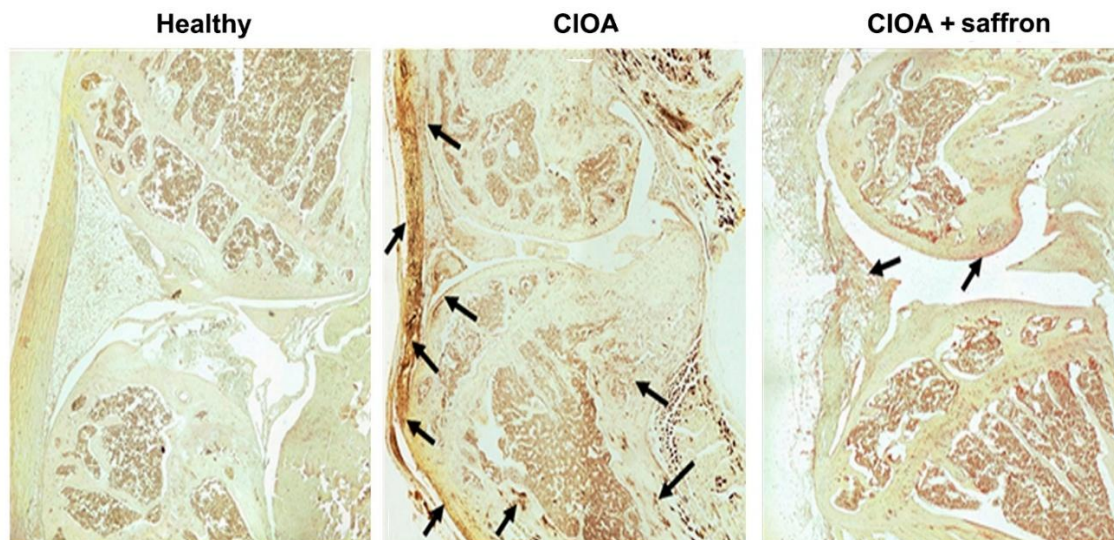
В групата на животните с CIOA беше установена значителна дезорганизация на структурата на хрущяла, ерозия на ставната повърхност и нарушавания на костите (Фигура 38, в средата). Наличието на изразено отлагане на колаген (интензивно синьо оцветяване) в периартикуларните области предполага фиброза, докато в синовиалната мембрана и ставната капсула беше отчетена възпалителна клетъчна инфилтрация. Наблюдавани бяха също така деградация на хрущяла (CD), фиброза (Infl) и образуване на остеофити (O). За сравнение, при третираниите с шафран мишки с CIOA беше установено частично възстановяване на архитектурата на хрущяла и намаляване на фиброзните зони в сравнение с нетретиранията група с CIOA (Фигура 38, дясно). Отлагането на колаген е по-слабо изразено, възпалителната инфилтрация (Inf) изглежда намалена и въпреки, че се наблюдават някои дегенеративни промени, цялостното хистологично увреждане е отслабено.



Фигура 38 Хистологичен анализ на колянна става на групи от експериментални животни с индуциран остеоартрит; в ляво – Здрави нетретиран животни; в средата – Животни с CIOA; в дясно– Животни с CIOA и третирани с 50 mg/kg шафран; Отчетени и отбелязани са основни патологични изменения – образувани остеофити (O), разрушаване на хрущяла (CD), частична липса на костно-мозъчно вещество (BML и инфилтрация (Inf); отлагане на фиброзна тъкан (Infl). Резултатите са представителни от 5 анализирани животни. Оцветяване по метода на Масон Трихром; Оригинално увеличение x 40.

3.3.7. Хистологичен анализ на стави на животни с CIOA за определяне ефекта от терапията с 50 mg/kg *Crocus sativus* чрез прилагане на специфично оцветяване по Ван Коса

За хистологична оценка на калцификацията бе извършено оцветяване по метода на Von Kossa. Интензивното сребърно оцветяване показва повишена калцификация, субхондрална костна ерозия и инфилтрация на остеокласти (черни стрелки) в групата CIOA (Фигура 39, в средата). Тези находки определят тежката костна деструкция и отлагане на минерали, както и дисфункцията на костното ремоделиране свързани с CIOA. За разлика от тях, животните от групата на CIOA третирана с шафран показаха значително намаляване на калцификацията и отслабване на костното увреждане, което предполага защитен ефект на екстракта при костната патология на CIOA (Фигура 39, дясно). Както се очакваше, в контролната група на здравите животни не бяха наблюдавани признаци на патологична калцификация или увреждане на костите (Фигура 39, ляво).



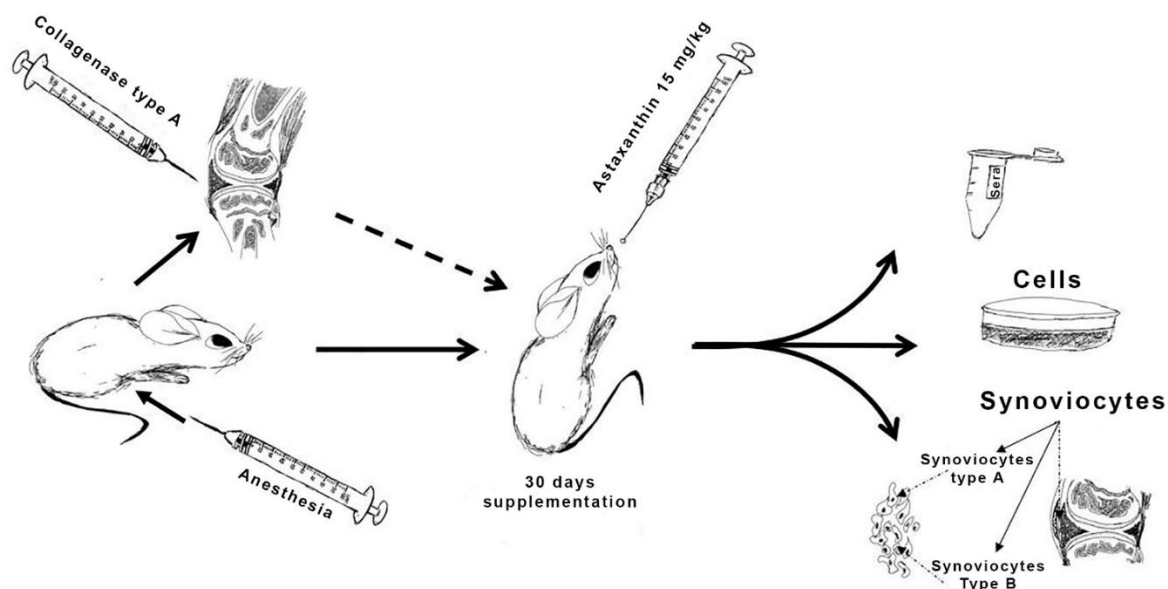
Фигура 39. Хистологичен анализ на колянна става на групи от експериментални животни с индуциран остеоартрит; в ляво – здрави нетретирани животни; в средата – животни с CIOA; в дясно – животни с CIOA и третирани с 50 mg/kg шафран; Отчетени и отбелязани са основни патологични изменения – субхондрална костна ерозия с остеокластична инфилтрация и деструкция на костите (черни стрелки). Резултатите са представителни от 5 анализирани животни. Оцветяване с Von Kossa; Оригинално увеличение x 40.

3.4. Проследяване ефектите на терапия с AST

3.4.1. Проследяване ефектите на терапия с природен AST върху патогенезата на колагеназа-индуциран остеоартрит при експериментален миши модел

Експерименталните животни бяха третирани през всички етапи от развитието на остеоартрита до хронифицирането на заболяването (Фигура 40). Подробно описание на методологията и стъпките по индуциране на остеоартрита е представен в раздел материали и методи.

Бяха сформирани 4 експериментални групи – 2 от групите бяха от здрави животни третирани съответно със зехтин или с астаксантин, разтворен в зехтин и две групи животни с индуциран остеоартрит – съответно третирани с астаксантин или с физиологичен разтвор. След 30 дневна терапия животните бяха жертвани и беше направен анализ на хистологични препарати, пролиферативната способност на изолираните клетъчни популации, разпределение на клетките в слезката, синовиума, костния мозък и перитонеума. Стимулирането, третирането и индуцирането на CIOA *in vivo* бяха извършени върху инбредната линия Balb/c мишки по утвърдената досега схема.

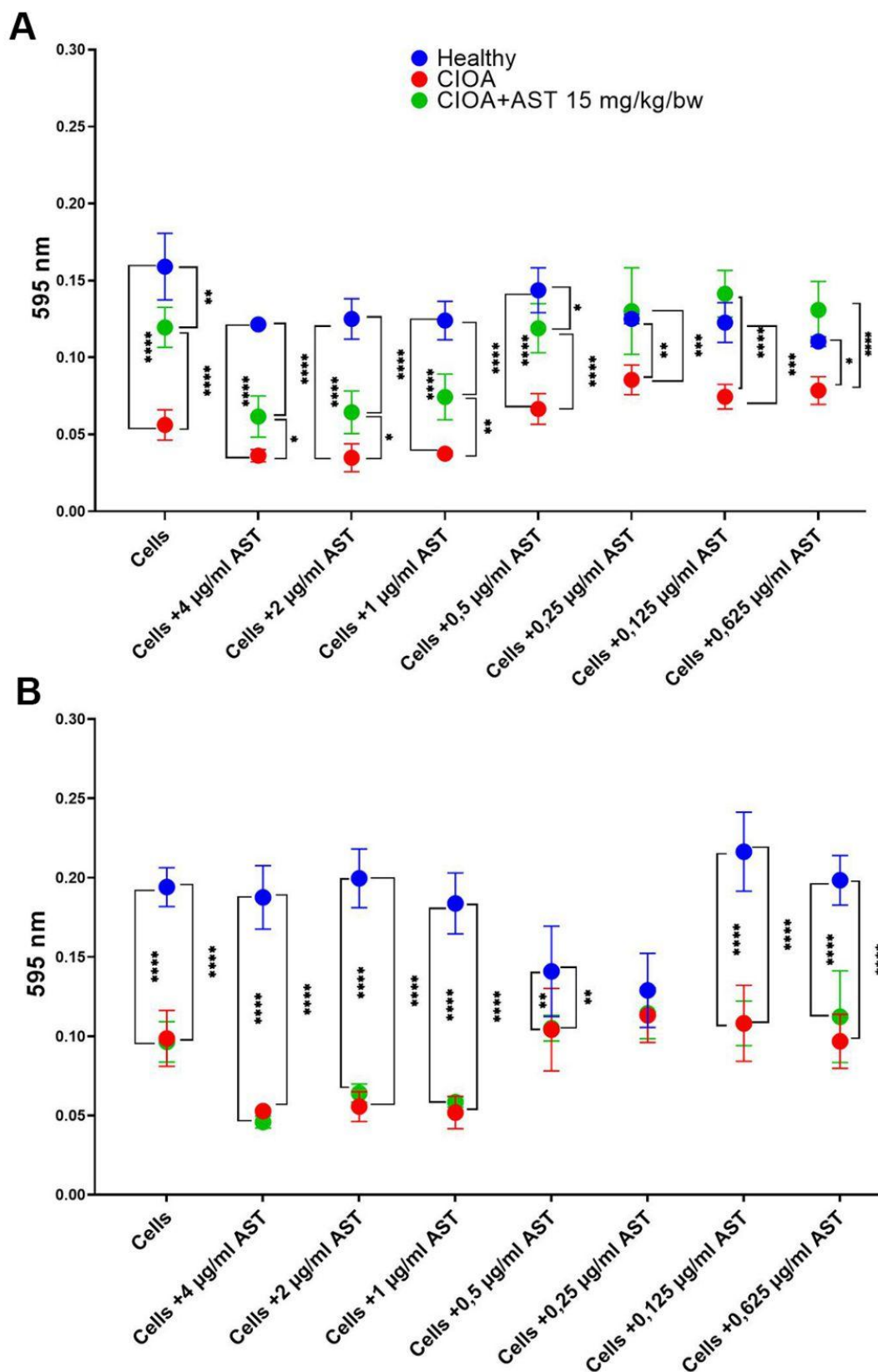


Фигура 40. Модел на третиране на животни с CIOA с природен AST.

3.4.2. Ефект на природния и синтетичен AST върху пролиферацията на миши спленоцити

Спленоцитните клетки от експерименталните групи бяха инкубирани в присъствието на синтетичен Asta в концентрации от 4 до 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ в продължение на 48 и 72 часа. Поради специфичните си особености каратеноида беше разтворен в DMSO, като концентрацията на разтворителя беше допълнителна контрола в отделна проба за доказване на липса на токсичност. Резултатите от MTT теста показват, че приложените концентрации не са токсични за клетките, а наличието на DMSO също не е повлияло на клетъчната пролиферация. Наблюдава се дозозависим ефект, като по-високите концентрации на AST проявяват статистически-достоверна потискаща функция върху спленоцитната пролиферация във всички групи (Фигура 41A) [16].

Данните дават представа за *ex vivo* ефектите на каратеноида. Клетките, изолирани от третираните животни имат малко по-ниски нива на пролиферация в сравнение с нетретираните мишки. Наблюдава се повишаване на клетъчната пролиферация при средни и ниски дози, особено между 0, 5 и 0, 625 mg/kg синтетичен AST. В данните от 72-часовата инкубация с природния продукт, нивата на пролиферация както при болните контроли, така и при третираните мишки са ниски за всички концентрации. Въпреки това, и в двете групи се наблюдава тенденция към намаляване на пролиферацията (Фигура 41A и B).

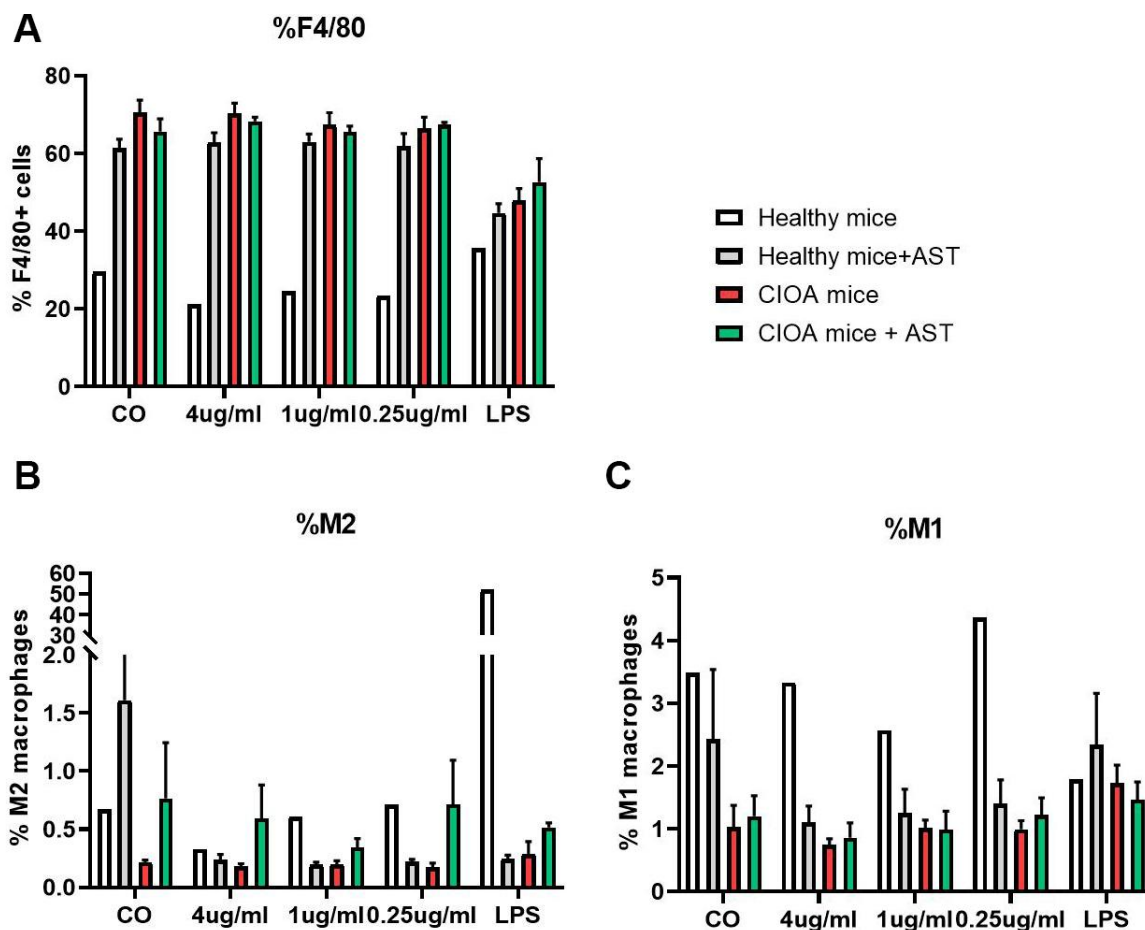


Фигура 41. Изследване на пролиферацията *ex vivo* на спленоцити от всички експериментални групи, култивирани за (A) 48 h. (B) 72 h. в присъствието на различни концентрации на AST. Данните са представени като средна стойност и $\pm$ SD ($n = 5$). Данните бяха анализирани чрез two-way ANOVA тест, последван от теста на Tukey за множествено сравнение. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$

3.4.3. Ефект на природен и синтетичен астаксантин върху

перитонеални макрофаги

Чрез промиване на перитонеума бяха изолирани макрофаги, които бяха култивирани в присъствието на допълнителен синтетичен AST и след това анализирани (Фигура 42).



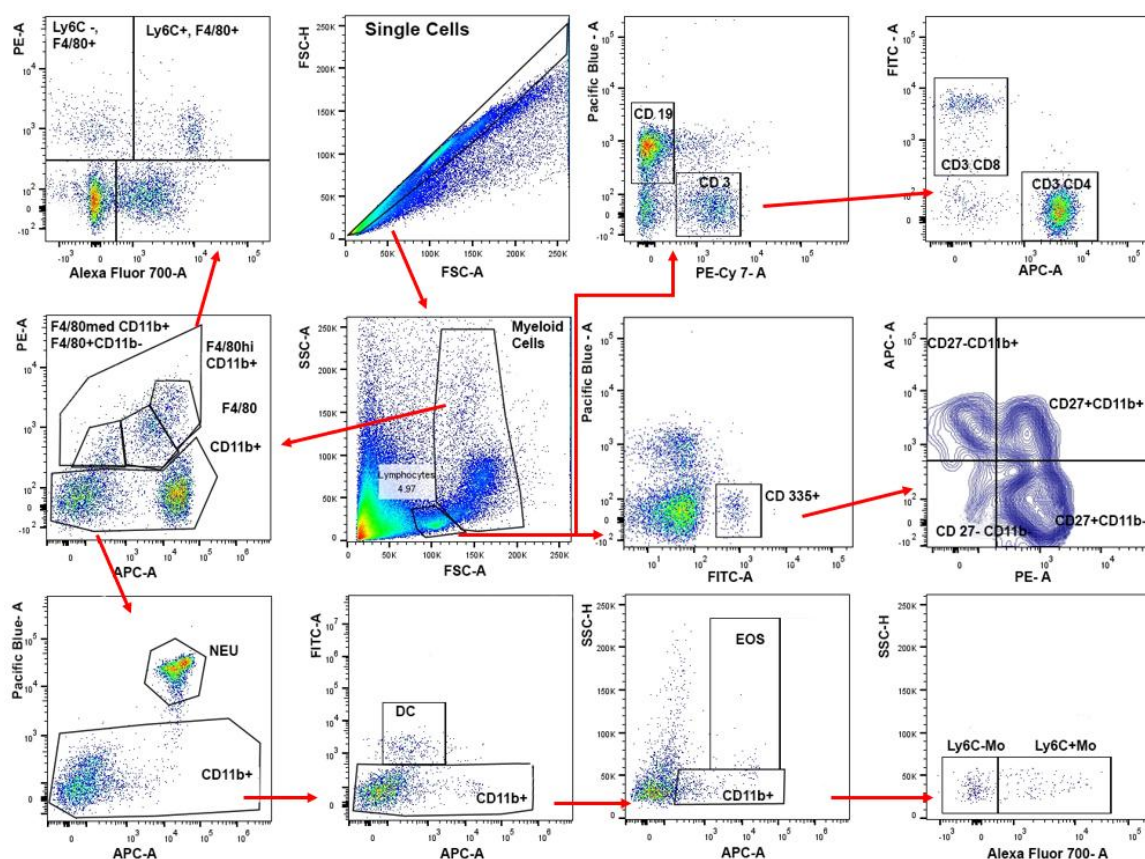
Фигура 42 FACS анализ на перитонеални макрофаги тип M1 и M2 от експериментални групи: здрави, мишки с AST, CIOA, животни с CIOA и AST 15 mg/kg/тегло. Ex vivo добавяне на синтетичен AST и третиране в продължение на 29 дни с естествен AST. Данните са представени като средна стойност и $\pm SD$ ($n = 5$).

Резултатите показаха изместване на типа макрофаги от M1 към M2 фенотип. Освен това беше отчетено, че популациите, характеризирани с маркери F4/80, Ly6G и C11b имаха сходен общ брой анализирани клетки, което допълва достоверността на получените данни. Процентът на M2 клетките при здрави и животни с CIOA, третирани с 15 mg/kg AST показва значително увеличение в сравнение с другите групи (Фигура 42B). След допълнително стимулиране със синтетичен AST се открива тенденция за повишаване на макрофаги тип M1, получени от здравите животни и запазване на по-ниски стойности при другите групи (Фигура 42C). По

отношение на общата популация клетки, при всички концентрации на синтетичен AST се забелязва статистически достоверно повишаване на макрофагите спрямо здравата контрола.

3.4.4. FACS анализ

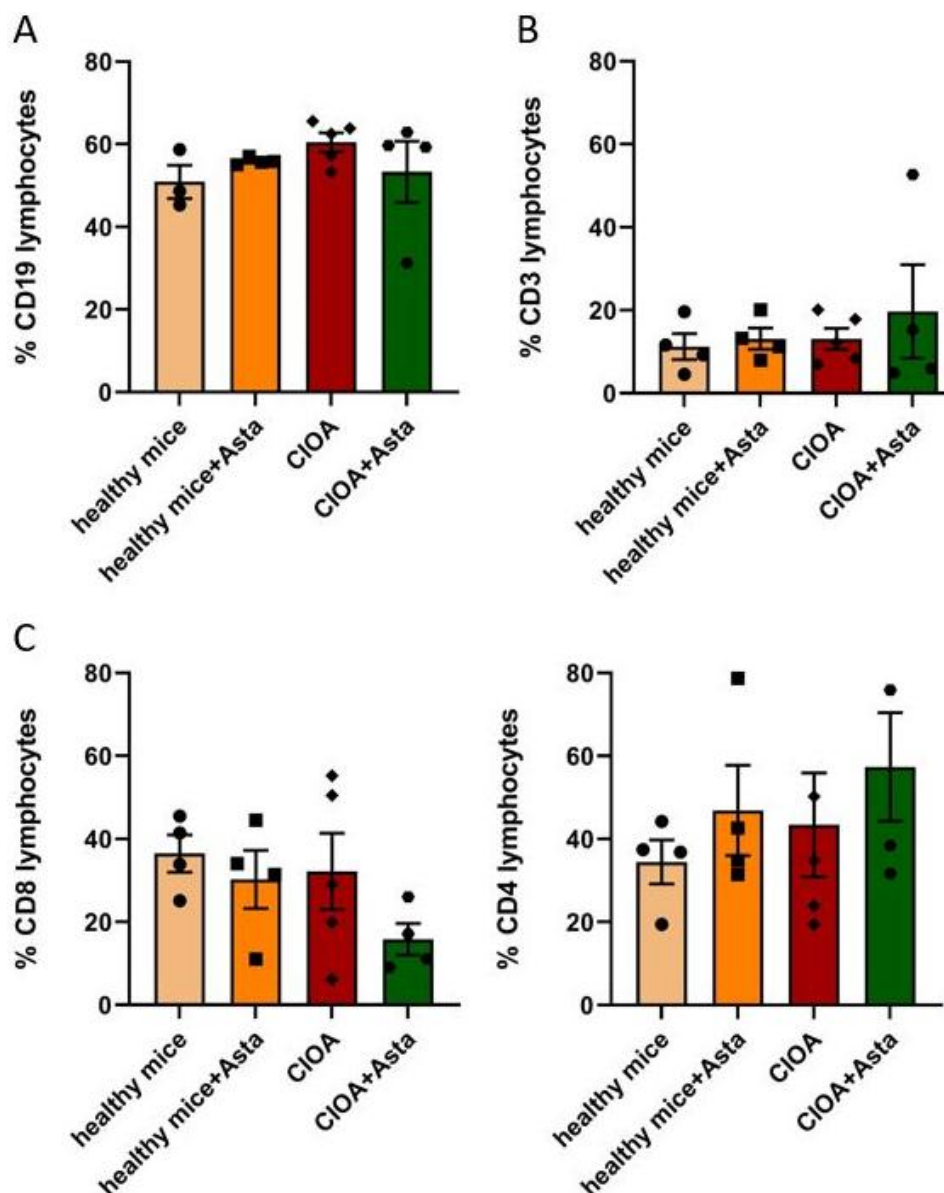
Проследихме разпределението на клетъчните популации в синовиалната течност след третирането с природен AST. За целта направихме диференциално определяне на специфичните клетки по редица клетъчни маркери. Стратегията ни за определяне на отделните групи е представена на Фигура 43, където подробно е онагледено как от лимфоцитната популация поетапно са отдиференцирани макрофаги, активирани субпопулации макрофаги, моноцити, еозинофили, неутрофили, дендритни клетки, НК клетки и субпопулациите им, както и Б и Т клетките.



Фигура 43. Стратегия за флоуцитометричен анализ на отделните клетъчни популации, проследени в клетъчни изолати от животни от всички експериментални групи.

3.4.4.1. Б и Т-клетъчните лимфоцитни популации

Анализът на основните клетъчни типове в лимфоцитната популация показва тенденция към по-нисък процент В лимфоцити при третираните с AST в сравнение с животни с остеоартрит (Фигура 44А).



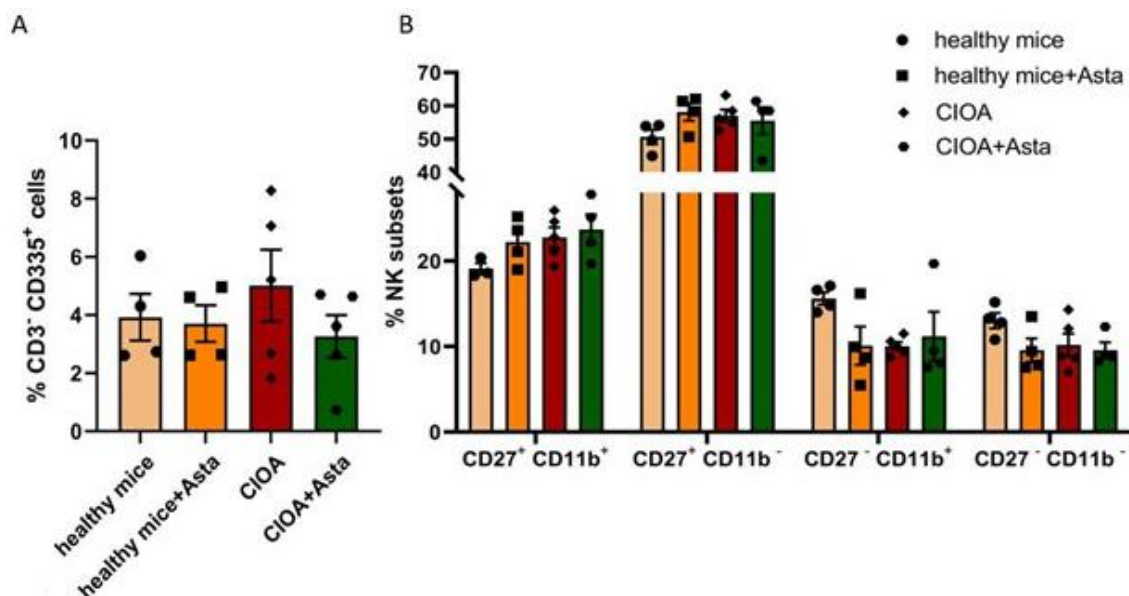
Фигура 44. Анализ на ефекта на AST върху лимфоцитни клетъчни популации в синовиални клетъчни изолати чрез флоуцитометричен анализ. (A) Процент Б клетки в синовиум на здрави животни и на животни с колагеназа-индуциран остеоартрит и третиран с AST; (B) Процент Т-клетки в синовиум на здрави животни и на животни с колагеназа-индуциран остеоартрит и третиран с AST; (C) Процент цитотоксични Т-клетки в синовиум на здрави животни и на животни с колагеназа-индуциран остеоартрит и третиран с AST; (D) Процент Т-хелперни клетки в синовиум на здрави животни и на животни с колагеназа-индуциран остеоартрит и третиран с AST. Данните са представени като средна стойност и $\pm SD$ ($n = 5$).

Не са наблюдавани значителни промени в Т-клетките в нито една от анализираните групи (Фигура 44B).

По отношение на субпопулациите на Т-клетките, позитивни по маркерите CD4 и CD8 се открива тенденция за увеличаване на Т-хелперните клетки и намаляване на цитотоксичните при третираната група (Фигура 44C). Наблюдава се леко повишаване на субпопулациите, изолирани от здрави животни третиран с AST, в сравнение със здравите контроли.

3.4.4.2. NK - клетъчни популации

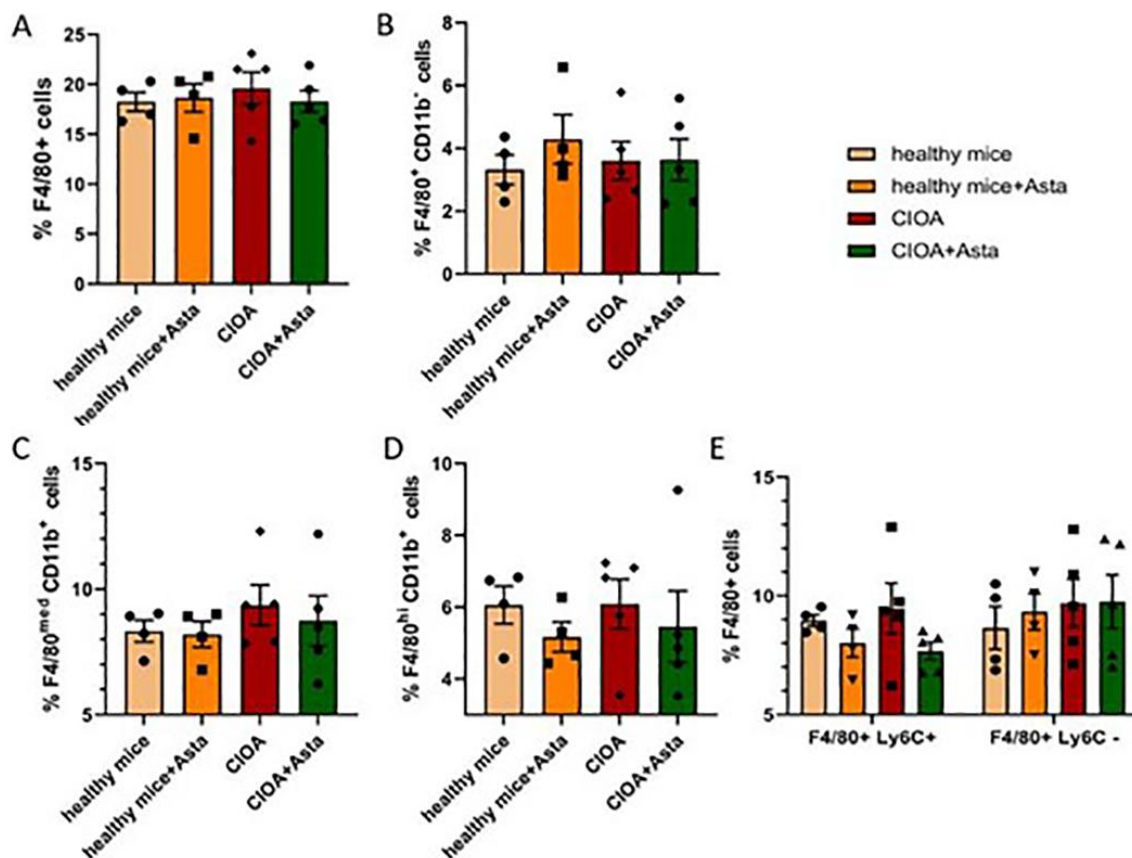
Проследяването на популацията на NK клетките показва статистически незначимо намаляване на техния процент при животните с терапия в сравнение с тези с индуциран артрит без терапия (Фигура 45А). Въпреки това, анализът на субпопулациите на NK клетките не показва разлики между експерименталните групи (Фигура 45В).



Фигура 45. Анализ на ефекта на AST върху лимфоцитни клетъчни популации в синовиални клетъчни изолати чрез флоуцитометричен анализ. (А) Процент CD335 – експресиращи клетки и (В) субпопулации на NK клетките в синовиум на здрави животни и на животни с CIOA и третирани с AST. Данните са представени като средна стойност и $\pm SD$ ($n = 5$).

3.4.4.3. Макрофаговата клетъчна популация

При проследяване на състоянието на макрофагите положителни по маркера F4/80⁺ се вижда, че няма значителни отклонения при всички групи (Фигура 46А). Състоянието на популацията, която се отделя по маркерите F4/80⁺CD11b⁻ е подобна, като се отличава тенденция за по-висок процент клетки при здравата третирана контрола. Анализът на данните показва, че терапията с AST, макар и статистически незначително, намалява процента на макрофагите F4/80^{med} CD11b⁺, които участват пряко в хроничното възпаление и разрушаването на хрущяла (Фигура 46В, С). Тази тенденция се потвърди и при макрофагите F4/80^{hi}CD11b⁺, които са силно активирани и се свързват с острите възпалителни реакции (Фигура 46D). Животните, третирани с AST показват постоянна тенденция към намаляване на тази клетъчна популация в сравнение с животните с CIOA (Фигура 46Е).

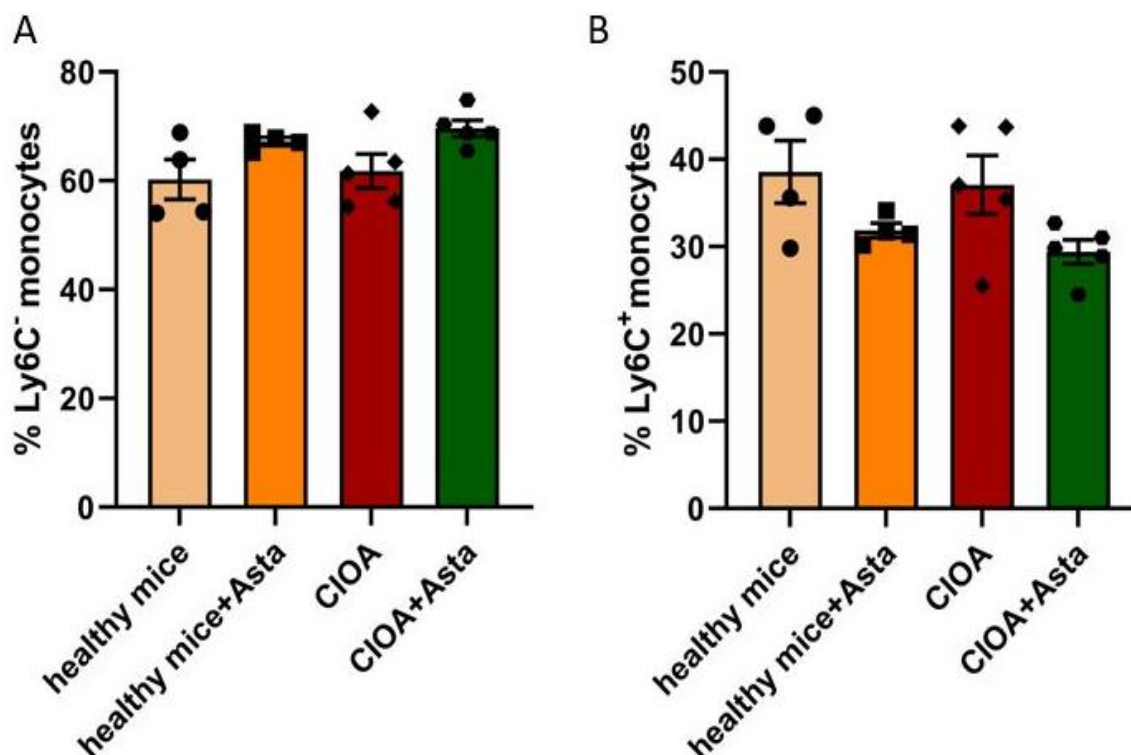


Фигура 46. Анализ на ефекта на AST върху лимфоцитни клетъчни популации в синовиални клетъчни изолати чрез флуцитометричен анализ. (A) Процент F4/80^{hi} CD11⁺ F4/80⁺ CD11⁻; (B) F4/80^{hi} CD11⁺; (C) F4/80^{hi} Ly6C⁺; (D) F4/80^{hi} Ly6C⁻ – популации макрофаги в синовиум на здрави животни и на животни с CIOA и третирани с AST. Данните са представени като средна стойност и $\pm$ SD (n = 5).

Влиянието на AST върху диференциацията на макрофагите тип M1/M2 е видимо, както и намаляването на популацията на макрофагите F4/80^{hi}Ly6C⁺(Фигура 46D). Тези макрофаги секретират матриксни металопроотеази и други протеолитични ензими, които разграждат хрущялния матрикс. Те също така участват в отделянето на свободни радикали (ROS), които увреждат клетъчните компоненти и засилват възпалителния процес.

3.4.4.4. Моноцитна клетъчна популация

Ly6C-моноцитите имат важна роля в разрешаването на възпалението и насърчаването на възстановяването на тъканите чрез диференциране в макрофаги M2. Тези клетки спомагат за възстановяване на хомеостазата на ставите, като произвеждат противовъзпалителни цитокини и допринасят за ремоделирането на тъканите (Фигура 47B).



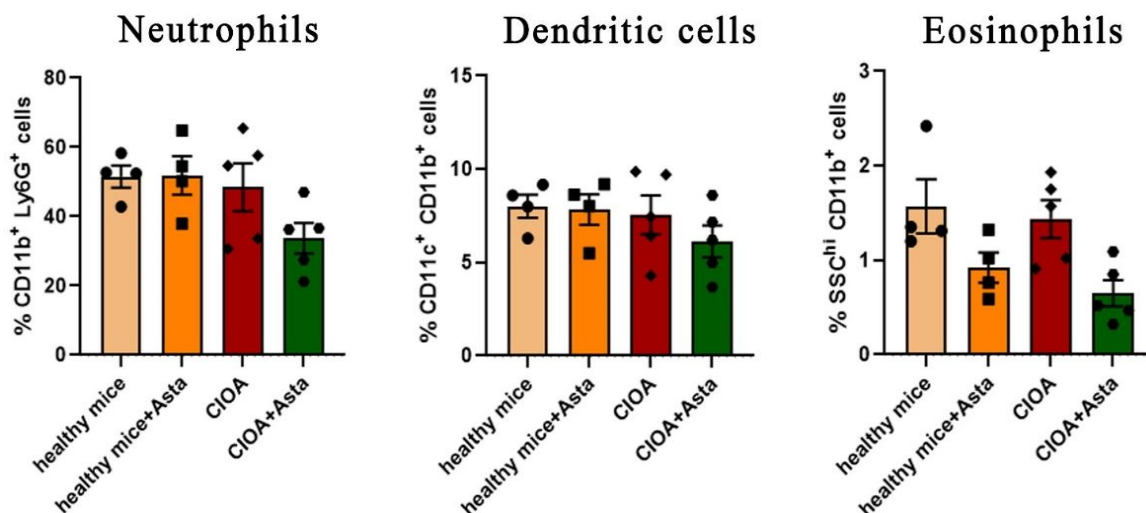
Фигура 47. Анализ на ефекта на AST върху лимфоцитни клетъчни популации в синовиални клетъчни изолати чрез флоуцитометричен анализ. (A) Процент $Ly6C^{+}$ моноцити в синовиум на здрави животни и на животни с CIOA и третирани с AST; (B) Процент $Ly6C^{-}$ моноцити в синовиум на здрави животни и на животни с CIOA и третирани с AST. Данните са представени като средна стойност и $\pm SD$ ($n = 5$).

Резултатите от флоуцитометричния анализ на синовията на експерименталните животни разкриват намаляване на процента на $Ly6C^{+}$ моноцитите в групите, третирани с атаксантин в сравнение с животни с CIOA. Едновременно с това, както при групата със, така и при тази без индуциран остеоартрит, третирани с атаксантин се наблюдава увеличение на процента на $Ly6C^{-}$ невъзпалителни или патрулиращи моноцити (Фигура 47A).

3.4.4.5. Неутрофилна клетъчна популация

Ефектът на атаксантина върху развитието на остеоартрит показва ясна тенденция към понижаване на процента на неутрофилите в синовията на експериментални животни, третирани с AST. На етапа, на който е извършен анализът (30 дни след индукцията) не е регистрирана значителна разлика в популацията на неутрофилите между здрави и болни животни. Също така, не се забелязва повлияване на здравите контроли, третирани с каратеноида (Фигура 48).

Резултатите от групата животни с CIOA, подложени на терапия с AST, показват наличието на контролни механизми при увеличаването на неутрофили в ставната капсула (Фигура 48 - лява графика).



Фигура 48. Анализ на ефекта на AST върху клетъчните популации на неутрофилите, еозинофилите и дендритните клетки в синовиални клетъчни изолати чрез флоуцитометричен анализ. Данните са представени като средна стойност и $\pm SD$ ($n = 5$).

3.4.4.6. Дендритна клетъчна популация

Терапията с атаксантин показва тенденция за въздействие върху популацията на дендритните клетки, представените резултати обаче не определят окончателно кой конкретен клетъчен тип е засегнат. Необходими са допълнителни проучвания за изясняване на този въпрос (Фигура 48 - средна графика).

3.4.4.7. Еозинофилна клетъчна популация

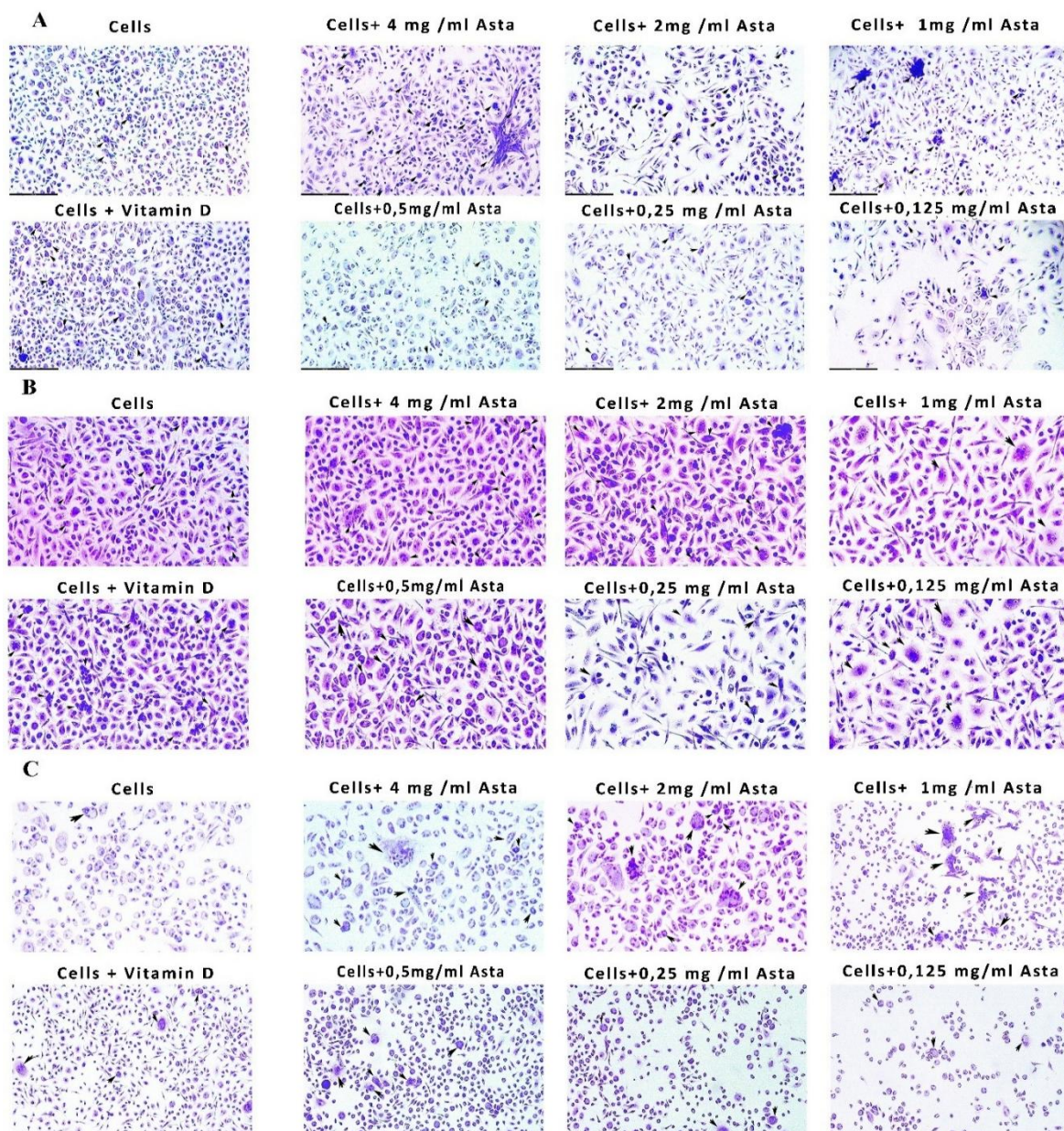
Нашите резултати показват намаляване на процента на еозинофилите както при здрави животни, третирани с AST, така и при животни с CIOA, подложени на същата терапия (Фигура 48 - дясна графика).

3.4.5. Костен мозък

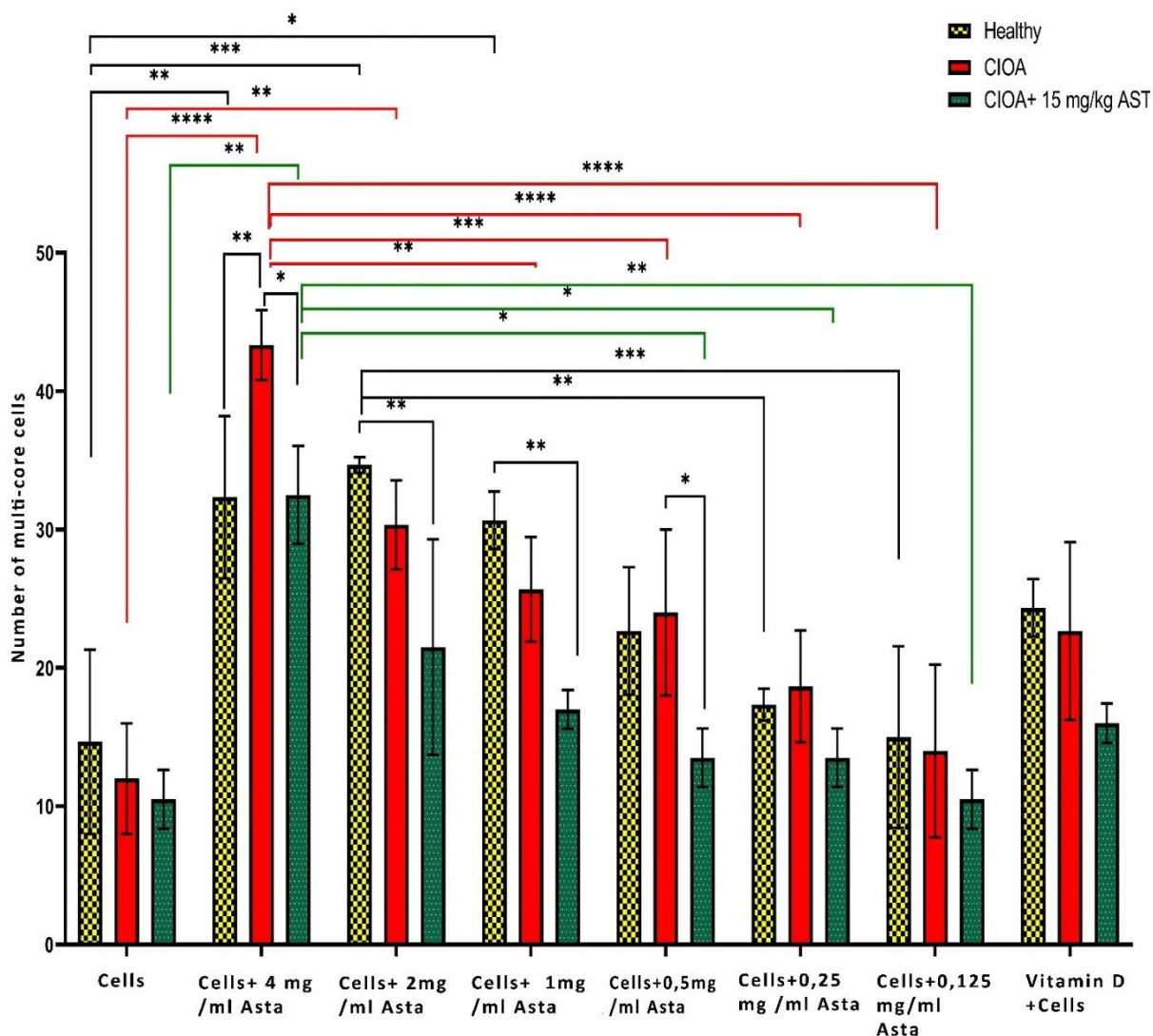
По-цялостното разбиране на процесите в коляното и състоянието на клетъчните популации, особено на тези, свързани с развитието на остеоартрит наложи изследването на костния мозък. В многобройни публикации се отбелязва, че активирането на клетките на костния мозък не е типично при ОА [17]. Подобни констатации са представени на Фигура 49 и Фигура 50, където са проведени наблюдения на изолати от костен мозък от здрави и третирани животни. Анализирана е диференциацията в остеобласти и остеокласто-подобни клетки след стимулиране със специфични молекули и витамини.

3.4.5.1. Остеокласто-подобна диференциация на клетки изолирани от костен мозък

Резултатите показват, че при болните и третираните животни процентът на диференцираните клетки е по-нисък спрямо здравата контрола (Фигура 49 и Фигура 50).



Фигура 49. Култивиране *ex vivo* на клетки от костен мозък и модулиране на диференциацията до многоядрени клетки. (A) Клетки, изолирани от здрави животни с *ex vivo* стимулация с различна концентрация на AST; (B) Клетки, изолирани от мишки с CIOA и *ex vivo* стимулация с различна концентрация на AST; (C) Клетки, изолирани от животни с CIOA, лекувани в продължение на 30 дни с 15 mg/kg/тегло AST и *ex vivo* стимулация с различна концентрация на екстракта. Черните стрелки показват преброените клетки. Данните са представени като средна стойност и $\pm SD$ ($n = 5$). Микроскопско увеличение 10x.

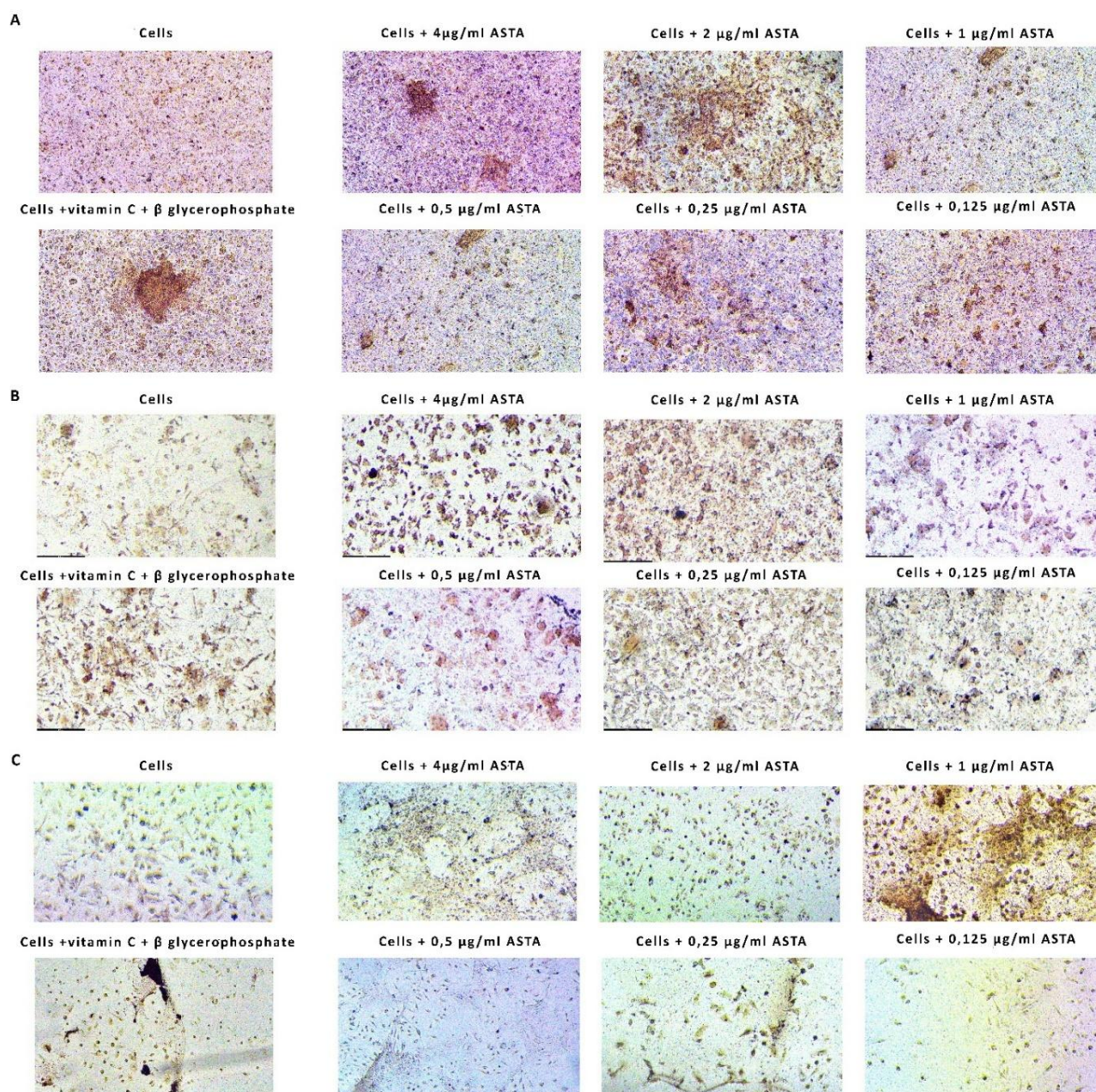


Фигура 50 Графика на култивираните *ex vivo* и стимулирани *in vitro* костно-мозъчни многоядрени клетки. Данните са представени като средна стойност и $\pm$ SD ($n = 5$). Данните са анализирани чрез Image J, двустранен ANOVA тест, последван от тест за множествено сравнение на Бонферони. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

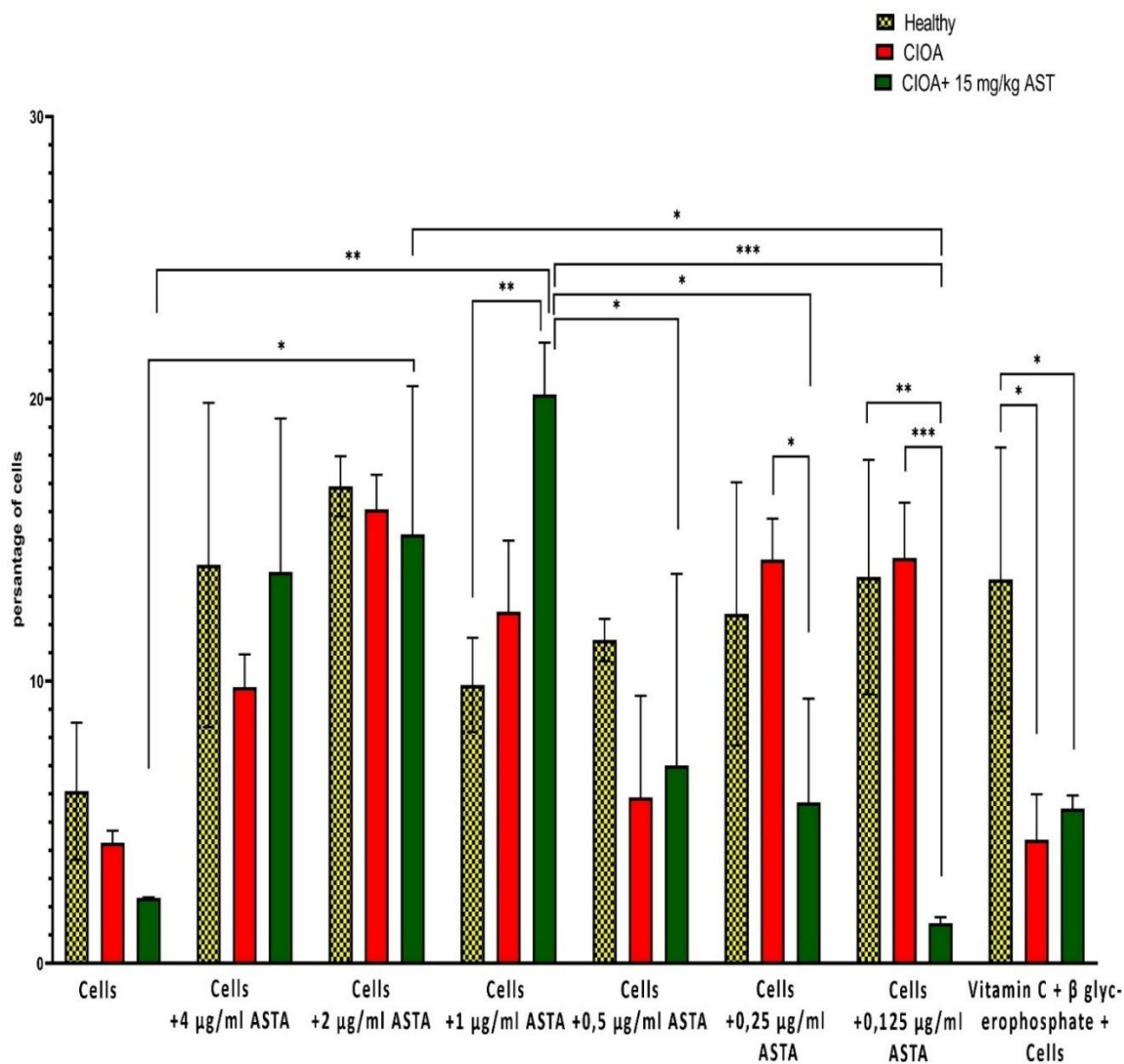
Интересно е, че почти всички многоядрени клетки увеличават броя си след стимулация с AST. Заслужава да се отбележи обаче, че пикът на диференциация при здравите животни е достигнат след стимулация с 2 mg/ml AST, докато при другите групи пикът настъпва след добавка на 4 mg/ml AST (Фигура 50). Ниските концентрации на AST не повлияват значително процеса на диференциация или го увеличават незначително в сравнение с контролната група.

3.4.5.2. Остеобластна диференциация на клетки изолирани от костен мозък

По-нататъшното наблюдение на образуването на остеобласти показва значително увеличаване на клетките след стимулиране с AST.



Фигура 51. *Ex vivo* култивиране на клетки от костен мозък след модулиране на диференциацията до остеобластни клетки. (A) Клетки, изолирани от здрави животни с *ex vivo* стимулация с различна концентрация на AST; (B) Клетки, изолирани от мишки с CIOA и *ex vivo* стимулация с различна концентрация на AST; (C) Клетки, изолирани от животни с CIOA, лекувани в продължение на 30 дни с 15 mg/kg/тегло AST и *ex vivo* стимулация с различна концентрация на екстракта. Микроскопско увеличение 10 x.

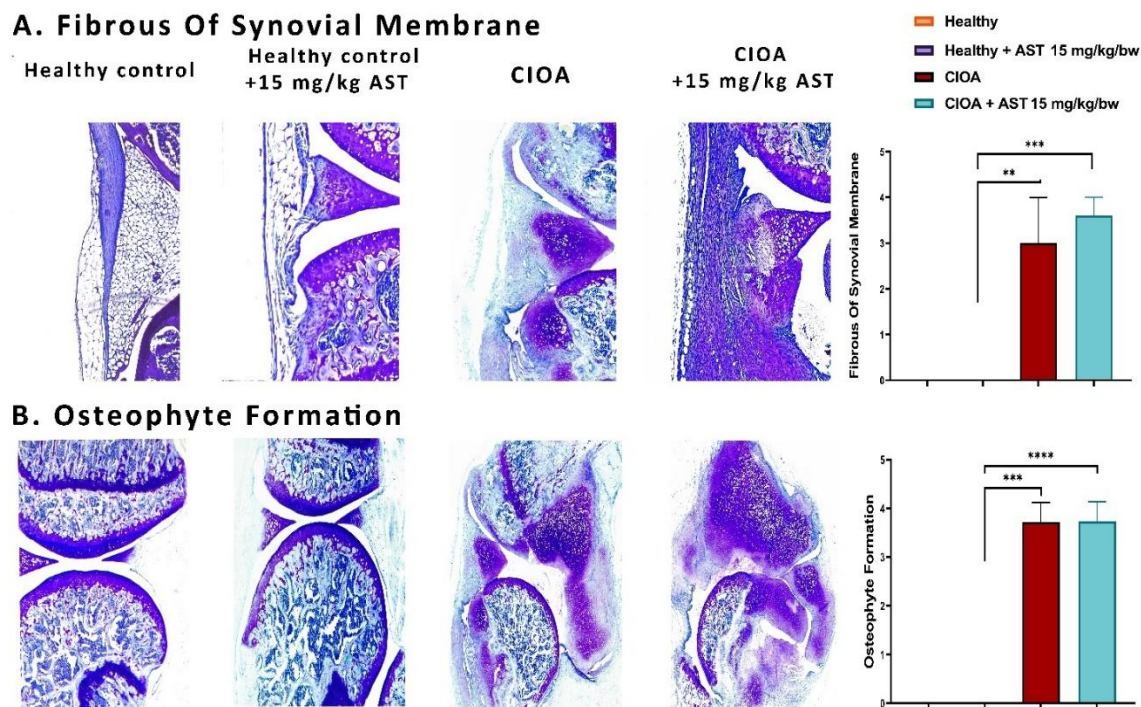


Фигура 52. Графика на култивираните *ex vivo* и стимулирани *in vitro* костно-мозъчни клетки, диференцирани до остеобласти. Данните са представени като средна стойност и $\pm SD$ ($n = 5$). Данните са анализирани чрез Image J и двустранен ANOVA тест, последван от тест за множествено сравнение на Бонферони. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.**

Данните от различните групи показват, че здравите животни са реагирали най-силно дори при ниски концентрации (Фигура 51 и Фигура 52). Най-голямото активиране както при живони с CIOA, така и при здравите мишки настъпи след добавяне на 2 mg/ml AST. Интересно е, че клетките от лекуваната група реагират най-силно при допълнително стимулиране с 1 mg/ml AST, което показва, че диференциацията се задейства при по-ниски концентрации в сравнение с другите групи. Проследяване на състоянието на клетките без допълнително стимулиране показва, че процента на образуваните остеобласти от здравите контроли е по-висок от тези със заболяването и третираната група.

3.4.6. Хистологичен анализ и оценяване

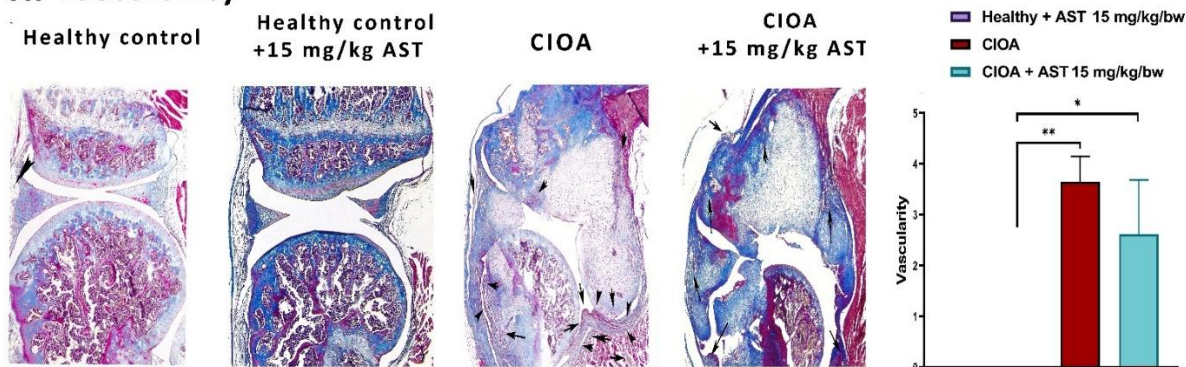
Хистологичният анализ на проби от коляното от всички групи потвърди функцията на астаксантина за подобряване на ремоделирането на засегнатите стави. Данните на Фигура 53-Фигура 56 илюстрират увеличаване на фиброзните влакна в синовиалната мембрана особено в групата, третирана с астаксантин, където нивата са най-високи. Структурата на синовиалната мембрана и в двете групи с CIOA (Фигура 53A) е силно променена.



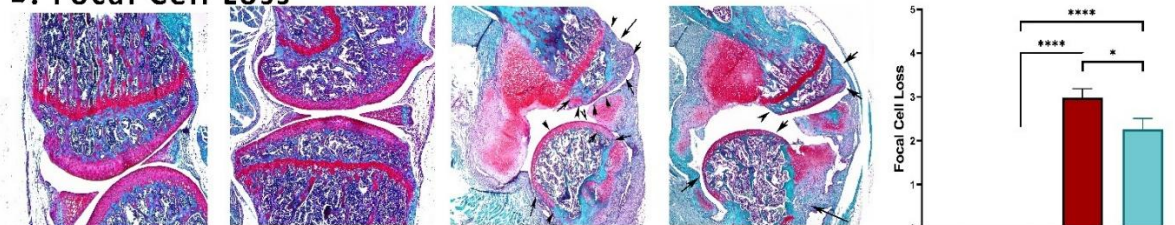
Фигура 53 Хистопатологична количествена оценка на аксиалните патологични промени в ставата чрез хистологичен анализ на колянната става на групи експериментални животни с CIOA и третиращи с AST. (A) Фиброза на синовиалната мембрана; (B) Изграждане на остеофити. Оцветяване с Толуидиново синьо. Увеличение 5х. Данните са представени като средна стойност и SD ($n = 5$). Данните са анализирани чрез двустранен ANOVA тест, последван от тест за множествено сравнение на Бонферони. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Увеличено беше и образуването на остеофити (Фигура 53B), подкрепено от множество клетки, участващи в тези процеси. Лечението с AST намали образуването на патологични кръвоносни съдове (Фигура 54A), което е добре представено в групата с CIOA, както е посочено с черни стрелки и обобщено в графиката. Оцветяването с Trihom Masson ефективно отличава тези структури.

A. Vascularity



B. Focal Cell Loss

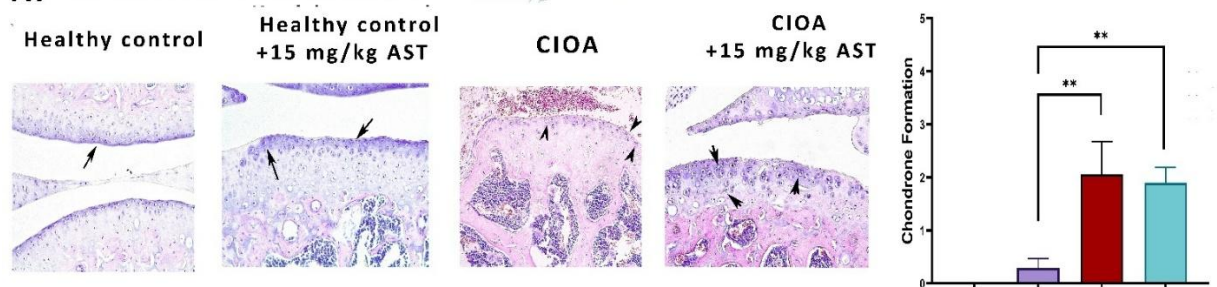


Фигура 54. Хистопатологична количествена оценка на аксиалните патологични промени в ставата чрез хистологичен анализ на колянната става на групи експериментални животни с CIOA и третиран с AST. (A) Образуване на патологични кръвоносни съдове; (B) Загуба на клетки във всички слоеве на хрущяла. Оцветяване с Трихром на Масон (A) и Сафранин О (B). Увеличение на 5х. Черните стрелки показват патологичните промени. Данните са представени като средна стойност и SD (n = 5). Данните са анализирани чрез двустранен ANOVA тест, последван от тест за множествено сравнение на Бонферони. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

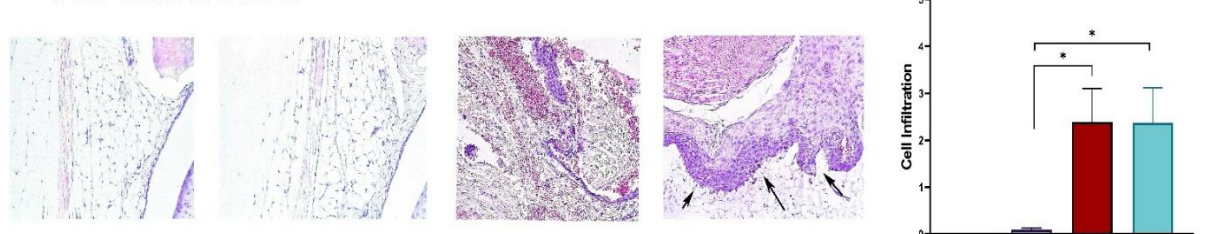
На Фигура 54B се наблюдава статистически значимо намаляване на фокалната загуба на клетки. Въпреки, че нивата в групата с CIOA остават по-високи от тези в групата с AST, черните стрелки показват големи области на загуба на клетки.

Резултатите за образуването на хондроцитни лакуни на Фигура 55A показват статистически значимо увеличение на активирането на популацията, както е посочено с черните стрелки. Въпреки това, нивата в третираната група са по-ниски от тези в групата с CIOA.

A. Chondrone Formation



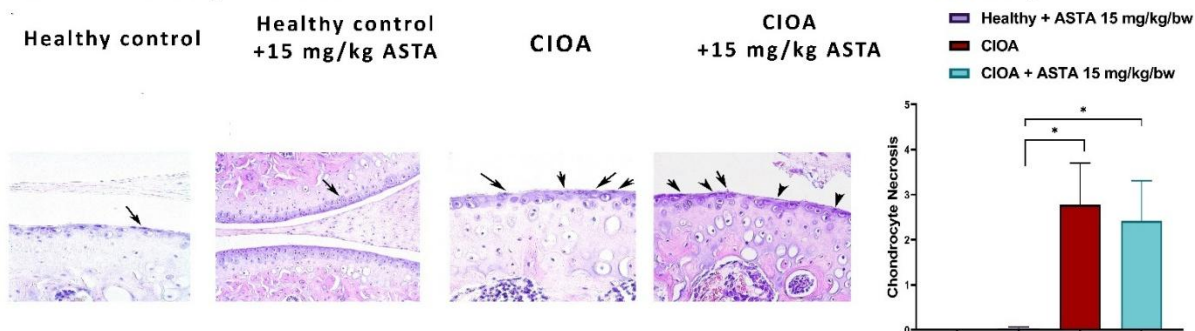
B. Cell Infiltration



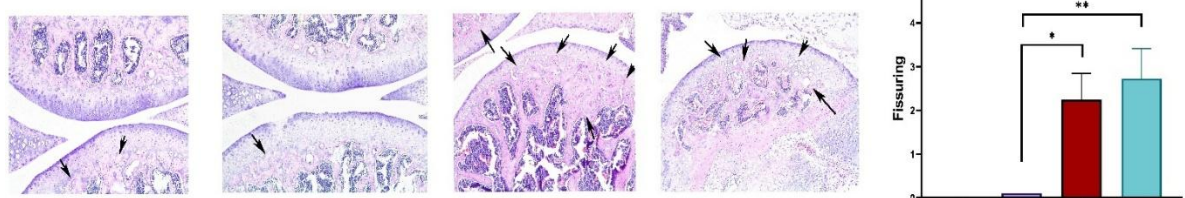
Фигура 55 Хистопатологична количествена оценка на аксиалните патологични промени в ставата чрез хистологичен анализ на колянната става на групи експериментални животни с CIOA и третиран с AST. (A) Групиране на хондроцитите в хондронни формации; (B) Клетъчна инфилтрация. Оцветяване с Хематоксилин и Еозин. Микроскопско увеличение 10 x. Черните стрелки показват патологичните промени. Данните са представени като средна стойност и SD (n = 5). Данните са анализирани чрез двустранен ANOVA тест, последван от тест за множествено сравнение на Бонферони. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

Лечението с AST не повлиява значително увеличената клетъчна инфилтрация (Фигура 55B) и само леко намалява некрозата (Фигура 56A). Образуването на напуквания в различните слоеве на хрущяла не е овладяно от тереапвтичното прилагане на каратеноида (Фигура 55B). Данните от здрави животни на Фигура 53-Фигура 56 показват, че при здравите животни между 8 и 12 седмици тези изменения не се наблюдават.

A. Chondrocyte Necrosis



B. Fissuring



Фигура 56. Хистопатологична количествена оценка на аксиалните патологични промени в ставата чрез хистологичен анализ на колянната става на групи експериментални животни с CIOA и третирани с AST. (A) Отмиране на хондроцити на повърхността на хрущяла; (B) Образуване на напуквания в повърхностните и дълбоките слоеве на хрущяла. Оцветяване с Хематоксилин и Еозин. Микроскопско увеличение A - 40 x и B - 20x. Черните стрелки показват патологичните промени. Данните са представени като средна стойност и SD (n = 5). 10 x. Данните са анализирани чрез двустранен ANOVA тест, последван от тест за множество сравнение на Бонферони. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

4. Дискусия

Остеоартритът е едно от най-разпространените ставни заболявания в света, придружено от болка, ограничаване на подвижността и инвалидизация [184, 185]. По данни на Световната здравна организация, 343 милиона души в света са засегнати от него [189]. Въпреки, че ОА се свързва предимно със стареенето има и други важни фактори, които допринасят за развитието му. Те включват генетични предпоставки, основни анатомични и ортопедични заболявания (напр, вродени изкълчвания на тазобедрената става), затлъстяване, основни наследствени или придобити метаболитни заболявания, ендокринни заболявания, различни нарушения на костната обмяна и кръвосъсирването, ставни инфекции, отлагане на кристали, предшестващ ревматоиден артрит (РА) или анамнеза за ставна травма, мускулна слабост или ставна нестабилност [190]. Тежестта на заболяването варира от локално до хронично възпаление и води до дегенерация на ставния хрущял, синовит и дори до костно ремоделиране [191]. Клиничните симптоми на ОА са подуване и възпалителна болка, но синовитът е пряко отговорен за няколко диагностични симптоми и отразява структурната прогресия на заболяването чрез действието на няколко разтворими медиатора [192]. За това мултифакторно болестно състояние не е открит единен етиологичен механизъм, общ за всички форми на заболяването.

В настоящото проучване използвахме химически способ за индукция на остеоартрит, което ни позволи възпроизвеждане на някои от основните симптоми, свързани с появата и развитието на болестта при хората. Изясняването на точната роля на различните клетъчни типове на вродения и придобития имунитет, както и на взаимодействията и комуникацията между тях би подпомогнало изясняването на патофизиологията на човешкия ОА. Продуктите от разграждането на хрущяла, които се освобождават в синовиалната течност се фагоцитират от синовиалните клетки, като по този начин се засилва синовиалното възпаление. На свой ред, активираните синовиални клетки произвеждат провъзпалителни медиатори, които водят до прекомерно производство на протеолитични ензими, отговорни за разграждането на хрущяла, създавайки положителна обратна връзка. Възпалителният отговор се усилва от активираните синовиални Т-клетки, В-клетки и инфилтриращи макрофаги. В-клетките рядко се откриват в синовиалните мембрани при ОА, но тези, които са налице са в активирано състояние [100]. В хрущяла на ОА са идентифицирани антитела срещу автоантигени, като разпадните продукти на колаген тип I и тип II, което предполага, че тези антитела се произвеждат локално от инфилтриращи синовиални В-клетки [193].

Нашите резултати потвърждават предишните проучвания, съобщаващи за инфилтрация на В лимфоцити след острата фаза на възпалението. Степента на инфилтрация на В-клетките е в пряка зависимост от степента на локалното възпаление. Все още е отворена дискусията дали генерирането на антитела срещу собствени структури, като продукти от разграждането на

хрущяла е първичен или вторичен имунен отговор. Освен това, автоантитела срещу хрущялни и костни протеини, като протеина на междинния слой на хрущяла [193] и YKL-39 [194], които са открити в серума на пациенти с РА са открити и при пациенти с ОА. Освобождаването на различни остеоартритни антигени може да стимулира хроничния автоимунитет чрез В-клетките, който от своя страна може да модулира положително или отрицателно болестния процес [191, 192].

CD4⁺ Т-клетките са от решаващо значение за насочването на подходящ имунен отговор по време на защитата на гостоприемника и за патогенезата на възпалителните заболявания. Също така Т-клетъчните отговори към протеините на хрущялния матрикс са по-силни при пациенти с ОА, отколкото при здрави индивиди. В нашето проучване установихме повишен дял на CD3⁺CD4⁺ Т лимфоцити в синовията на експерименталните животни. Други проучвания вече потвърждават, че в ранните етапи на болестта се инфилтрират предимно CD4⁺ Т лимфоцити с преобладаваща Th1 клетъчна поляризация [193, 194]. CD3⁺CD4⁺ клетките са най-разпространеният тип активирани възпалителни клетки в синовията по време на ОА. Ние показвахме наличието на високо активирани спленоцитни CD4⁺ Т клетки в началото на развитието на болестта в сравнение с резидентните в синовията. От друга страна, процентът на CD3⁺CD8⁺ Т-клетките беше значително намален в сравнение с контролната група, но статусът на активиране на тези клетки беше много повишен по отношение на експресията на CD107a. Неотдавна CD107a (лизозомно-асоцииран мембранен протеин-1 или LAMP-1) беше описан като маркер за дегрануация на CD8⁺ Т-клетките след стимулация [198]. Необходими са допълнителни изследвания, за да се определи точната роля на CD8⁺ Т-клетките в патогенезата на колагеназа-индуцираният остеоартрит.

Основната роля на НК-клетките е елиминирането на заразените с вируси и трансформирани клетки и секретирането на про-инфламаторни цитокини. Има данни, които предполагат, че тези популации се увеличават във възпалените стави на пациенти с различни артритни заболявания, включително пациенти с РА [196-198]. НК клетките са представени в синовиалните течности на пациенти с РА и се смятат за важни участници в разрушаването на костите. Ролята на НК клетките в патологията на остеоартрита се нуждае от допълнителни изследвания. Huss и сътр. показват, че НК клетките съставляват близо 30% от CD45⁺ мононуклеарния клетъчен инфилтрат в синовиални тъкани от пациенти с ОА [46]. В нашето проучване наблюдавахме обратната тенденция, която може да се определи от естеството на модела. Въпреки, че докладвахме намален дял на НК клетките в слезката и локално в синовиума, клетките бяха с високо ниво на активация по отношение на експресията на CD107a. Използването на CD107a като маркер за функционалната активност на НК клетките позволява идентифицирането на голяма част от активираните НК клетки, които дегранулират при липса

на цитокинова секреция. Можем да предположим, че това са резидентни клетки, а не инфилтрирани. При по-задълбочен фенотипен анализ на NK клетките в костния мозък установихме промяна в клетъчната диференциация от цитотоксичен фенотип ($CD335^{+}CD27^{-}CD11b^{+}$) в ранната фаза на ОА до клетки с ефекторен фенотип ($CD335^{+}CD27^{+}CD11b^{-}$) в хроничната фаза на заболяването. С изключение на инфилтрацията на NK клетките, нашите данни потвърждават резултатите на Jaime и сътр., при които NK клетките от периферната кръв имат ясна цитотоксична функция, но в синовиалната течност от пациенти с ОА представят имунорегулаторен фенотип [177].

Някои функционални единици на вродената имунна система - моноцити и макрофаги - също участват в патогенезата на ОА. Моноцитите и макрофагите са хетерогенни клетъчни популации, които проявяват значителна степен на пластичност. Протеините в синовиална течност от става с ОА могат да насочат макрофаговия отговор към производство на възпалителни цитокини чрез TLR-4 сигналния път. Освен това, макрофагите могат да се самоподдържат независимо от моноцитите [46]. Изглежда, че макрофагите в здравия синовиум са предимно независими от моноцитите и техният принос за защита на хомеостазата на ставата включва формиране на бариера и почистване от остатъци [202]. Както се очаква, в острата фаза на заболяването броят на макрофагите беше по-висок в сравнение със здравата контрола. Нашите резултати показаха, че неklasическите $Ly6C^{-}$ моноцити се диференцират във възпалителни макрофаги (M1) по време на развитието на артрит и са отговорни за патогенезата на заболяването. Данните предполагат, че циркулиращите $Ly6C^{-}$ моноцити, намиращи се в ставата при нараняване, могат да управляват развитието на ставното възпаление.

Еозинофилите са многофункционални гранулоцити, считани за ефекторни клетки, участващи в хелминтни инфекции и алергични заболявания. Тези клетки участват в регулирането на адаптивните имунни реакции, особено при възпалителни и автоимунни заболявания. По отношение на ролята им в патологията и развитието на ОА са необходими допълнителни проучвания.

Известно е също така, че по време на острото възпаление полиморфонуклеарните неутрофили мигрират в тъканите, последвани от увеличение на моноцити, които по-нататък се диференцират в тъканни макрофаги [203]. Wang и сътр. са показали, че неутрофилите са основният източник на ензими, разграждащи хрущяла при миши модел на ранен ОА [204]. Докладвани са много противоречиви резултати относно клетъчната инфилтрация при ОА, като редица различни клетъчни типове допринасят за възпалителните процеси. Възможни причини за тези различни резултати могат да бъдат хетерогенността по отношение на възпалителната активност и разнообразните експериментални постановки.

Флоуцитометричният анализ на синовията на мишките на 7-ия, 14-ия и 30-ия ден след инжектирането на колагеназа може да бъде обогатен и чрез специфични хистологични находки в отделните етапи на болестта, напр. по-голямата инфилтрация на мононуклеарни клетки (моноцити, макрофаги и CD4 Т клетки) съответства на синовиалното възпаление (синовит) и новообразуваните кръвоносни съдове. Синовитът и неговите симптоми са налице преди да са настъпили костните промени и възпаление, като има много по-голямо значение в ранната фаза на заболяването, поради ставната нестабилност и първоначалните хрущялни лезии. Тези изменения водят до производството на провъзпалителни цитокини и медиатори на ставното увреждане. Проучването ни показва, че синовиалната мембрана се удебелява в ранните фази на ОА. Открива се васкуларизация, експресия на възпалителни клетки и медиатори, което определя по-висок хиперпластичен и възпалителен компонент на синовиита в този етап. Други автори потвърждават, че синовитът може да бъде рисков фактор за прогресия на ОА. На по-късен етап от развитието на ОА калцираният хрущялен слой изчезва, а костната пластина се удебелява значително за сметка на костния мозък.

При индуциране на остеоартрит чрез инжектиране с колагеназа се активират процеси на Т-клетъчна диференциация. Веднага след ангажирането на Т-клетъчният рецептор (TCR), CD69 се експресира, като участва в пролиферацията, активацията, индуцирането и предаването на сигнали към лимфоцитите и NK клетките. CD69 задвижва процеса на активиране, което в същност подпомага по-високата експресия на CD25 от Т-клетките, а това от своя страна предопределя поведението на различните Т-клетъчни популации. CD25 е алфа веригата на рецептора за IL-2 и се експресира конститутивно на повърхността на няколко подтипа периферни кръвни лимфоцити, като регулаторни Т клетки и паметови Т клетки.

Хроничният характер на ОА, променливостта в появата на симптомите и скоростта на прогресия при хората представляват предизвикателства за клиничните проучвания. Разбирането на патогенезата на ОА и нейната многофакторна етиология чрез използването на индуцирани животински модели като мощни изследователски инструменти дава възможност за разработване на нови и ефективни лечения.

Понастоящем няма ефективна терапия, която да може да възстанови увредената структура и функция на хрущяла и синовиалната тъкан при ОА. Последният етап от лечението на ОА е заместване на ставата. Освен аналгетиците и нестероидните противовъзпалителни средства (НСПВС), ограниченията на конвенционалната медицина за лечение на ОА показват повишена необходимост от нови, безопасни и ефективни терапии за пациентите с ОА. Използването на комплементарната и алтернативната медицина, включително билковите терапии, има потенциал да осигури решение на този проблем. През последните години усилията на учените са насочени към изучаване на ефектите и механизмите на действие на различни природни вещества от

растителен или животински произход. Съществуват редица проучвания, които доказват положителното въздействие на различни растителни екстракти върху профилактиката и лечението на остеоартрит [205]. Шафранът, получен от изсушените червени стигми на *C. sativus* е една от най-скъпите подправки в света, поради трудните условия за производство на стигмите. Различни части от растението се използват широко в хранително-вкусовата промишленост, като добавка за оцветяване и ароматизиране на храни. Той се използва и като лекарство в традиционната медицина.

В настоящото проучване използвахме модел на ОА, предизвикан чрез вътреставно инжектиране на колагеназа, като база за изпитване на противовъзпалителните и защитните свойства на екстракта от *C. sativus*. Шафранът е богат източник на множество активни съставки, включително каротеноиди, флавоноиди, терпеноиди, аминокиселини и алкалоиди [203, 204]. Тези активни компоненти проявяват различни фармакологични ефекти, като например потискане на тревожността, противовъзпалителни, антиоксидантни, антивирусни, противотуморни, хипогликемични, хиполипидемични и подобряващи паметта свойства [205, 206]. Развитието на ОА включва активиране на имунната система и води до възпаление, в което важна роля играят моноцитите, неутрофилите, лимфоцитите и тромбоцитите [18]. Счита се, че цитокините са ключови преносители на сигнали за развитието на ОА и имунните клетки, като Т-клетки, макрофаги и синовиални фибробласти, докато хондроцитите участват в секрецията на различни цитокини, които регулират възпалителния отговор. Няколко проучвания разкриват повишени нива на провъзпалителни цитокини при ОА, като $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL1}\beta$, IL6 и IL17 [210]. Други имуномодулиращи цитокини, включително IL4 , IL10 , IL11 и IL13 са класифицирани като инхибиторни или противовъзпалителни, тъй като намаляват производството и/или активирането на провъзпалителните цитокини *in vitro* [211]. Хондропротективният ефект на IL4 и IL10 е доказан *in vivo* [60], а в хрущяла на ОА е отчетена отрицателна корелация между тяхната експресия и нивата на $\text{TNF}\alpha$ [212]. Съществуват редица проучвания, показващи ефекта на екстракта от шафран върху нивата на провъзпалителните и противовъзпалителните цитокини. Zeinali et al. съобщават за намаляване на серумните нива на провъзпалителни ензими и цитокини като COX-2, миелопероксидаза (MPO), фосфолипаза A2, iNOS, протеиноиди, $\text{TNF}\alpha$, NF- κB p65 и интерлевкини като $\text{IL1}\beta$, IL6 , IL12 , IL17A и $\text{IFN}\gamma$ след третиране с минзухара [213].

В нашето проучване потвърдихме, че терапията на мишки с CIOA с екстракт от шафран води до статистически значимо намаляване на нивата на провъзпалителния цитокин $\text{TNF}\alpha$ по дозозависим начин, в сравнение с контролните мишки с CIOA. Животинските серуми бяха изследвани и за оценка на противовъзпалителния цитокин IL4 , като беше установена тенденция към повишаване на нивата на IL4 с най-голяма значимост при третиране с 50 mg/kg шафран.

Макрофагите, като основен компонент на моноклеарната фагоцитна система играят важна роля в патогенезата на ОА. В отговор на стимулите на микросредата въз основа на тяхната активация, макрофагите могат да бъдат класифицирани както следва: класически активирани макрофаги (провъзпалителни, M1) и алтернативно активирани макрофаги (противовъзпалителни, M2). M1 макрофагите са отговорни за освобождаването на молекули, които са от решаващо значение за ставното възпаление, докато M2 макрофагите допринасят за възстановяването на тъканите и овладяване на възпалението [211, 212]. При ОА балансът между M1 и M2 макрофагите може да бъде променен, което е свързано с тежестта на ОА. Доказано е, че както възпалителните, така и деструктивните реакции зависят от макрофагите чрез индуциране на възпалителни медиатори, растежни фактори и протеинази [213, 214]. Тяхното модулиране може да е достатъчно за облекчаване на симптомите на ОА и предотвратяване на прогресията на заболяването.

Сингх и сътр. показват, че шафранът значително намалява броя на провъзпалителните макрофаги и благоприятства увеличаването на противовъзпалителните макрофаги при миши модел на колит [218]. В нашето проучване шафранът увеличава процента на F4/80⁺ положителните макрофаги в сравнение с контролните нетретирани мишки с СЮА. Необходим е по-подробен анализ на типа на образуваните макрофаги, но въз основа на нашите резултати бихме могли да предположим, че екстрактът от *Crocus sativus* стимулира M2 поляризацията. Третирането на СЮА мишки с изследвания екстракт също така доведе до намаляване на субпопулацията на CD3⁺CD8⁺ Т клетките и до намаляване на активирането на CD3⁺CD4⁺ Т клетките, особено при третиране с 50 mg/kg шафран. Като се има предвид, че M1 макрофагите индуцират Th1 имунен отговор може да се заключи, че шафранът може да повлияе на провъзпалителната каскада, но все още са необходими допълнителни изследвания за това дали ефектът е пряк или косвен.

Вече доказахме, че спленоцитната NK популацията при животните с СЮА е значително по-малка от тази в здравата контролна група, но е силно активирана [18]. Yaminet al. показват, че в синовиална течност на пациенти с ревматоиден артрит NK клетките присъстват в голяма степен и се считат за важни участници в разрушаването на костите [219]. Приложената терапия с екстракт от шафран не повлиява процента на CD3^{low}CD335^{hi} NK клетките, но се наблюдава намаляване на състоянието на активация по отношение на експресията на CD107a. При миши модел на ранен ОА е доказано, че неутрофилите са значителен източник на ензими, разграждащи хрущяла [202]. В нашето проучване отчитаме намаляване на популацията на неутрофилите в резултат на терапията с екстракт от шафран.

Различни проучвания показват антипролиферативното и мощно цитотоксично действие на шафрана и неговите компоненти кроцин и пикрокроцин и поради тази причина той се

използва най-вече като тестови агент за превенция и терапия на рака [206]. Множество *in vitro* и *in vivo* проучвания показват значителен проапоптотичен ефект върху различни ракови клетъчни линии [138, 217] и потискане на туморната прогресия при мишки [218, 219]. През последните години се наблюдава повишен интерес към изследване на ефектите на шафрана върху ставните заболявания. Коски и сътр. показват, че прилагането на кроцин върху човешки фетални остеобласти води до повишена клетъчна пролиферация [223].

Ние показахме, че спленоцити от мишки с СІОА имат по-високи нива на метаболитна активност *ex vivo* в сравнение със здравите контроли. Въпреки, че не е статистически значимо има тенденция за регулиране на тази метаболитна активност в животинските групи, третирани със 100 и 50 mg/kg шафран в сравнение с контролните нетретирани мишки с СІОА. Третирането *in vitro* с допълнителни дози шафран не повлиява допълнително активността на третираните групи, но показва стимулиращ дозозависим ефект при клетки от мишки с СІОА. Необходимо е да се проведат допълнителни експерименти за изследване на този ефект.

Сравнителният анализ на патохистологичните промени в ставите на животните от всички експериментални групи предполага заключението, че терапията с екстракт от *C. sativus* оказва благоприятен ефект върху протичането на заболяването. Лечението намалява костната деструкция и повлиява загубата на гликозаминогликани и протеоглики. Животните от трите терапевтични групи с екстракта имат запазен ставен хрущял в сравнение с контролната група.

Благоприятният ефект на терапията с 50 mg/kg шафран върху нивото на възпаление и подобряване на патохистологичните изменения в ставите на експерименталните животни повдига логичните въпроси относно потенциалния механизъм за потискане на заболяването. Анализът на локалните имунни клетъчни популации показва значителни разлики между третирани и нетретирани групи с СІОА. Някои от имунните клетки пряко повлияват патологичния процес, докато други типове клетки участват косвено чрез поддържащи функции. Костният мозък има функцията на резерв на миелоидни и лимфоцитни клетки, осигурявайки баланс между различните депа на имунни клетки.

Въпреки, че лечението с екстракт от шафран предизвика само незначителни промени в съотношенията на имунните клетки в сравнение със здравите контроли, бе наблюдавано значително увеличение на патрулиращите моноцити (CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6C^{lo}) при мишки, третирани със шафран, спрямо групата с индуциран остеоартрит (СІОА), особено на 14-ия ден от терапията. Подобно увеличение беше установено и в синовиалната тъкан, също на 14-ия ден, но без съпътстващо повишаване на M1 поляризацията на макрофагите в нито едно от двете места. Това наблюдение противоречи на предишни данни, според които Ly6C^{lo}– моноцитите инфилтрират ставата по време на ефекторната фаза на артрит и се диференцират в про-възпалителни M1 макрофаги, като по този начин допринасят за увреждането на ставата [224,

225]. Интересно е, че в съответствие с това, друга Ly6C^{lo} популация (F4/80^{hi} CD11c^+) беше значително намалена в костния мозък след терапия със шафран, докато се наблюдаваше рязко увеличаване в синовиума по време на ефекторната фаза на CIOA.

Нерезидентни за тъканите CD11b^+ F4/80^- Ly6C^+ макрофаги имат потенциала да регулират възпалението чрез диференциране в про-възпалителни M1 или противовъзпалителни M2 фенотипове след насочване към тъканите [225]. Не бяха установени промени в костния мозък между групите след терапията, но в синовиума се отчете значително намаление на 7-ия ден и увеличение на 14-ия ден. Тази динамика може да обясни положителния ефект на терапията върху овладяването на възпалението.

Въпреки, че CD11b^+ F4/80^- Ly6C^+ макрофагите участват в диференциацията към M1 или M2 фенотипове, не бяха установени съществени промени в нивата на M1 или M2 макрофаги нито в костния мозък, нито в синовиума в резултат на промените в популацията на CD11b^+ F4/80^- Ly6C^+ клетки в синовиалната тъкан. Освен това, при третираната със шафран група беше установено значително намаление на процента на макрофагите (F4/80^+) в ставите в сравнение с нетретираните CIOA контролни животни, което представлява допълнителен фактор, допринасящ за овладяването на възпалението.

Не бяха открити значими разлики в клетъчната популация на костния мозък между различните групи по време на хроничната фаза на CIOA (ден 30).

Много по-изразена клетъчна динамика се наблюдава в синовиалната тъкан в тази хронична фаза, което подчертава значението на терапевтичния прозорец и времето на приложение на терапията.

Неутрофилите също участват в патофизиологията на ОА, като играят комплексна роля. Неутрофилите са първите клетки, набрани във възпалената става и насърчават възпалението и деградацията на ставата, като произвеждат провъзпалителни цитокини и хемокини, свободни радикали (ROS), ензими, разграждащи матрикса и неутрофилни извънклетъчни капани (NETs). Същите клетки участват във възстановяването на ставите, като регулират имунния отговор и освобождават противовъзпалителни фактори [226]. Фенотипизирането на синовиалните клетки на животни, третирани с екстракт от шафран, показва значително намаляване на популацията на неутрофилите (CD11b^+ Ly6G^+) през целия период на лечение, докато в костния мозък такова намаляване не беше установено.

Лимфоцитите играят важна роля в прогресията на ОА, като както Т-, така и В-лимфоцитите участват в имуно-индуцираното възпаление и разрушаването на хрущяла на ставите при ОА. CD4^+ Т-лимфоцитите произвеждат IL-17, който може да активира Т-лимфоцитите, главно в ранния етап на възпалението. IL-17 повишава активността на хондроцитите и предизвиква разрушаване на хрущяла, като подпомага възпалението.

Активирани Т-клетки произвеждат IL-6, който има двойствено действие - ускорява или потиска тежестта на остеоартрита в зависимост от няколко фактора. Освен това, IL-1 β , TNF- α и IL-6 допринасят за разрушаването на ставния хрущял чрез различни механизми [227]

Диференциацията и активирането на остеобластите се регулират от различни имунни клетки, свързани в мрежа чрез сложни механизми и различни медиатори. Основна роля играят CD4⁺ Т лимфоцитите, които биха могли да стимулират диференциацията на мезенхимните стволови клетки (МСК) на костния мозък чрез секреция на IFN- γ , докато диференциацията на остеобластите може да бъде потисната от TGF- β , произвеждан от същите клетки. Освен това, IL-17 може да допринесе за индуцирането на остеобластната диференциация от МСК в костта. Регулаторните Т (Treg) клетки също могат да стимулират диференциацията на МСК в остеобласти чрез IL-17F, докато В клетките в синовиалната среда могат да стимулират образуването на остеокласти чрез стимулираната от TNF- α секреция на RANKL [227, 228].

Получените от нас резултати не показаха значителни промени в популациите на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетките, както и на В-клетките в костния мозък между отделните експериментални групи животни. Обратно, в синовиумът на мишки с CIOA след терапия с шафран беше установено увеличаване на CD4⁺ и намаляване на CD8⁺ Т клетките. В съответствие с горната дискусия, тези промени вероятно са свързани със ставната защита, предизвикана от екстракта от шафран, но по-нататъшни подробни анализи на клетъчните субпопулации биха могли да разкрият потенциалния механизъм.

NK клетките играят ключова роля в развитието и прогресията на ОА, като поддържат възпалението чрез взаимодействие с хондроцити, синовиоцити, остеокласти и други имунни клетки и имат отношение към тежестта на заболяването [229]. Въпреки че популацията на CD335⁺ NK клетки не се променя нито в костния мозък, нито в синовиума при двете групи артритни животни, при третираните с шафран животни беше установено значително увеличение на зрелите CD27-CD11b⁺ NK клетки в сравнение с контролните животни с CIOA. Тази субпопулация NK клетки показва повишен потенциал за насърчаване на образуването на остеокласти и намалена цитотоксичност и играе важна роля в патогенезата на ОА [230].

Клетъчната апоптоза също играе важна роля в дегенерацията на хрущяла, като част от патологията на остеоартрита. Нормалният хрущял при здрави мишки показва ниски нива на апоптоза, чието значение е да се отстранят увредените клетки. При ОА, повишената апоптоза поддържа продължаващото възпаление и допринася за разрушаването на хрущяла [231, 232]. Малкият брой клетки, изолирани от синовиума не ни позволи да извършим анализ на апоптозата, но използвахме спленоцити, изолирани от всички експериментални животни на 7-и, 14-и и 30-и ден след индуциране на ОА. Анализирайки апоптозата на В-клетките, установихме значително увеличаване на живите клетки и значително намаляване на ранните

апоптотични клетки при третираните с шафран мишки, в сравнение с нетретираните артритни животни на 30-ия ден. Сравнението на същите групи животни и анализите на Т-клетъчната апоптоза показаха подобряване на общата преживяемост на Т-клетките и значително намаляване на късната и ранната апоптоза във всички контролни точки след приложението на шафран. Изследвайки анализите за клетъчна пролиферация на спленоцити от всички експериментални групи след *ex vivo* стимулация с шафран, установихме дозозависимо увеличение на индекса на пролиферация и в двете групи мишки с СІОА спрямо контролите без *ex vivo* стимулация. Сравнявайки групите помежду им беше установено значително потискане след *ex vivo* инкубация с 1 mg/ml екстракт от шафран при *in vivo* третираните с шафран мишки спрямо нетретираните животни с СІОА. Дори да не може да отрази точно процесите в ставите по време на прогресирането на ОА, терапията с екстракт от шафран въздейства върху всички резервоари на имунни клетки, осигурявайки условия за преодоляване на възпалението, както и за привличане на различни видове клетки в ставната кухина.

Нарушената функция на остеокластите (клетки, които разрушават костта) и остеобластите (клетки, които образуват костта) при ОА допринася за прогресирането на заболяването, като води до ненормално костно ремоделиране и загуба на участъци от субхондралната кост, причинени от повишената активност на остеокластите и до дисбаланс в костното ремоделиране, поради намалената или променена функция на остеобластите [233]. В нашите експерименти установихме ефект на *in vivo* терапията с екстракт от шафран върху ограничаване на патологичното ставно ремоделиране, дължащо се на потискане на диференциацията на костнорезорбиращите клетки. Както се очакваше, диференциацията на остеобластите е потисната и при двете групи животни с СІОА, но *ex vivo* стимулацията с екстракт от шафран не повишава пролиферацията на костнообразуващите клетки при мишки, лекувани *in vivo*. Тази рамка е формирана въз основа на стимулиране на клетките на костния мозък, докато ефективна защита може да се наблюдава при анализи на ставите. Действително, при извършването на хистопатологични анализи бяха наблюдавани положителни резултати от терапията, тъй като деструкцията на костния мозък, наблюдавана при животни с СІОА е напълно потисната при болни мишки, третирани с екстракт от шафран. Леката дегенерация на хрущяла и по-високите нива на фиброза в групата с СІОА+50 mg/kg шафран вероятно се дължат на инхибиране на инвазията на възпалителни клетки в синовията и компенсаторния механизъм за ограничаване на уврежданията там, което предполага защитен ефект на терапията.

Астаксантинът (AST), ксантофилов каротеноид, се очертава като обещаващ кандидат с терапевтичен потенциал, поради мощните си антиоксидантни, противовъзпалителни и имуномодулиращи свойства [234]. Извлечен от източници като водораслите *Haematococcus pluvialis*, AST взаимодейства с клетъчните мембрани, като повишава своята бионаличност и

ефикасност. Предклиничните проучвания показват, че AST може да инхибира производството на свободните радикали (ROS) и провъзпалителни цитокини, да намали деградацията на хрущяла и да насърчи тъканното ремоделиране [222, 223]. Освен това е доказано, че AST модулира поляризацията на макрофагите от провъзпалителния фенотип M1 към противовъзпалителния фенотип M2, като потенциално възстановява имунната хомеостаза в засегнатите от ОА стави [236].

Резултатите от проведеното от нас проучване потвърждават по-ранни изследвания, демонстриращи потенциала на AST за смекчаване на прогресията на ОА. Тестовите за пролиферация на спленоцити разкриват дозозависими потискащи ефекти на AST, като при средните и ниските концентрации се проявяват оптимални благотворни ефекти. При остеоартрита балансът между $Ly6C^{+}$ и $Ly6C^{-}$ моноцитите е от решаващо значение за прогресията и развитието на заболяването. Възпалителните $Ly6C^{+}$ моноцити мигрират към ставите и се диференцират в M1 макрофаги, произвеждайки провъзпалителни цитокини (напр. $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ и $IL-6$) и ензими, разграждащи хрущяла. Повишеното присъствие на $Ly6C^{+}$ моноцити изостря хроничното възпаление и остеоартрита, като усилва възпалителния отговор и причинява увреждане на ставната тъкан [237].

Проточният цитометричен анализ показва положителното въздействие на AST върху популациите от имунни клетки, включително намаляване на $Ly6C^{+}$ възпалителните моноцити и едновременно увеличаване на $Ly6C^{-}$ патрулиращите моноцити, което е показателно за промяна към противовъзпалителна активност. Нещо повече, добавката на AST води до намалена активност на неутрофилите и макрофагите в синовиума, което допълнително подкрепя ролята му за потискане на хроничното възпаление [238].

Установено е, че в синовиалната течност на пациенти с ОА и други артритни заболявания присъстват предимно зрели cDCs и pDCs. Зрелите дендритни клетки експресират възпалителни тол-подобни рецептори (TLRs) и освобождават високи нива на възпалителни медиатори, които индуцират пролиферация на Th1 и Th17 клетките и насочване към продукцията на автоантигени. Това, от своя страна, води до инхибиране на хондрогенезата и предизвикване на дегенерация на хрущяла [226, 227].

Незрелите дендритни клетки, от друга страна, показват обещаващи ефекти. Те могат да модулират имунната регулация във възпалените стави, като освобождават IL-10, който индуцира пролиферацията на Tregs и стимулира хондрогенната диференциация на мезенхимните стволови клетки (МСК). Незрелите популации от дендритни клетки са склонни да засилват регулаторните отговори, докато зрелите популации на DC са склонни да предизвикват провъзпалителни лимфоцитни отговори (напр. Th1 и Th17), което води до синовит и дегенерация на хрущяла [228, 229].

Хистологичният анализ на проби от колянна става разкрива засилено ставно ремоделиране, увеличена фиброза на синовиалната мембрана и намалено образуване на патологични кръвоносни съдове при животните, третирани с AST. Важно е да се отбележи, че лечението с AST води до статистически значимо намаляване на фокалната загуба на клетки и образуването на хондрон - маркери за възстановяване на хрущяла и клетъчна активация [243]. Способността на AST да стимулира остеобластната диференциация, като същевременно инхибира остеокластната активност подчертава потенциала му за запазване на костната хомеостазата при ОА. Данните от други проучвания допълнително потвърждават тези наблюдения. Например, последователно се изтъква ролята на AST за намаляване на нивата на провъзпалителните цитокини и производството на ROS [244], което съответства и на нашите констатации за намалени популации от възпалителни клетки и засилено тъканно ремоделиране. Несъответствията в ефектите на AST в различните проучвания отразяват разликите в експерименталния дизайн, видовите модели и продължителността на лечението, което подчертава необходимостта от стандартизирани протоколи в бъдещите изследвания.

III. Заключение

По отношение на най-важната характеристика на ОА може да се каже, че лечението с екстракт от *C. sativus* значително потиска възпалението в ставите, намалява костната ерозия и спомага за запазването на ставния хрущял. Мощните биоактивни компоненти на тествания екстракт влияят на разрушителното действие на остеокластите и намаляват загубата на протеогликани и GAG в ставата. Всички хистологични находки, установени в групите третирани с екстракта, заедно с данните получени от серумните нива на цитокините, както и данните от пролиферативния тест показват, че екстрактът от шафран има благоприятен и защитен ефект при мишки с експериментално предизвикан ОА. Анализираният екстракт от *C. sativus* показва добрия терапевтичен потенциал на биоактивните си съставки за лечение на заболяването.

Терапията на мишки с индуциран CIOA с 50 mg/kg екстракт от шафран има благоприятен ефект върху хода на заболяването. Анализът на *ex vivo* експериментите показва намалени патохистологични промени в ставите на животните, запазен ставен хрущял, възстановени клетъчни свойства и фенотип, в сравнение с контролната група мишки. Терапията с екстракт от шафран при ОА е обещаващ подход за дългосрочно приложение и бъдещо клинично приложение.

Резултатите от проучването на терапия с астаксантин подчертават потенциала на каратеноида за модулиране на имунните реакции, насърчаване на възстановяването на хрущяла и запазване на целостта на ставите при остеоартрит. Въпреки, че астаксантина има потенциал на естествено средство за допълване на конвенционалните терапии са необходими допълнителни изследвания, за да се изяснят механизмите на действие, оптималните режими на дозиране и дългосрочната безопасност при хора. В крайна сметка, включването на астаксантин и екстракт от *C. sativus* в протоколите за лечение би могло да осигури цялостен и ефективен подход за намаляване или забавяне на прогресията на остеоартрита.

IV. Изводи

- Разработеният модел на остеоартрит осигурява разболяване при 100% от животните, силно изразена патология, характерна за заболяването и достатъчно време за третиране на експерименталните групи.
- Групите, третирани с екстракт от *Crocus sativus* проявяват промени в патологичната картина. Екстрактът намалява деструкцията на костта и хрущяла.
- Пролиферацията на спленоцитите *in vitro* и *ex vivo* показват стимулирането на клетките към пролиферация след третирането, като при групите третирани с 50 и 100 mg/ml тенденцията е обратна.
- Променя се съотношението между популациите при здрави, третирани и лекувани животни. Популациите при третираните мишки се доближават до тези на здравите контроли.
- Алкохолният екстракт на *Crocus sativus* оказва благотворно въздействие върху патогенезата на заболяването, забавя и ограничава негативните симптоми на ОА.
- Третирането на експериментални животни с астаксантин повлиява патогенезата на заболяването, като засилва процесите на ремоделиране на ставата.

V. Публикации и участия в научни прояви

Публикации във връзка с дисертационния труд:

B. Boneva, N. Ralchev, P. Ganova, A. Tchorbanov, and N. Mihaylova, “Collagenase-Induced Mouse Model of Osteoarthritis; A Thorough Flow Cytometry Analysis,” *Life* vol. 12, no. 11, p. 1938, 2022, [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/11/1938>

Journal Rank: JRC-Q1; Impact factor 3.2.

B. Boneva et al., “Crocus sativus Extract as a Biological Agent for Disease-Modifying Therapy of Collagenase-Induced Mouse Model of Osteoarthritis,” *Life*, vol. 13, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.3390/LIFE13040894.

Journal Rank: JRC-Q1; Impact factor 3.2.

Участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд:

1. Шести Европейски Конгрес по Имунология, 01-04.09.2021 г., гр. Белград, Република Сърбия.
2. В XVI Работна среща „Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти”, 24-26.11.2021 г., в ИЕМПАМ при БАН, гр. София, България.
3. Трети интердисциплинарен докторантски форум, 6-7.06.2022 г., град Кюстендил, България.
4. Трета национална научна конференция по биология за млади учени, 01.11.2022 г., в гр. Пловдив, България.
5. Научна конференция „Климентови дни 2022 г. “, 04.11.2022 г. гр. София, България.
6. Четвърти интердисциплинарен докторантски форум с международно участие, 16-19.05.2023 г., гр. Сандански, България.
7. Световен конгрес по имунология, 27.11- 02.12.2023 г. гр. Кейптаун ЮАР, Африка.
8. Пети интердисциплинарен докторантски форум, 16 -19.04.2024 г., град Кюстендил, България.
9. “Седми Европейски Конгрес по имунология”, 01- 04.09.2024 г. гр. Дъблин, Република Ирландия.