

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Бардонова Людмила Андреевна

**РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ
КЛЕТОК МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА И ПРОДУКЦИИ ИМИ
МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЦИТОКИНОВ В
ПАТОГЕНЕЗЕ ДЕГЕНЕРАЦИИ МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА**

14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Семинский Игорь Жанович

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент
Бывальцев Вадим Анатольевич

Иркутск – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Особенности строения и биологии межпозвонкового диска	12
1.2. Некоторые аспекты питания межпозвонкового диска и его нарушение	17
1.3. Современные представления о патогенезе дегенерации межпозвонкового диска	22
1.4. Роль провоспалительных цитокинов и иммунного ответа в дегенерации межпозвонкового диска	24
1.5. Подходы к регенерации межпозвонкового диска	27
1.6. Потенциальное применение костных морфогенетических белков	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	34
2.1. Характеристика исследованного клинического и аутопсийного материала ...	34
2.2. Исследование диффузионного транспорта и микроструктуры межпозвонкового диска	35
2.3. Методы работы с культурами клеток	38
2.3.1. Получение и культивирование клеток межпозвонкового диска	38
2.3.2. Культивирование клеток линии ТНР-1	40
2.4. Дизайн эксперимента	41
2.4.1. Исследование влияния провоспалительных цитокинов на клетки межпозвонкового диска	41
2.4.2. Исследование влияния костных морфогенетических белков на клетки межпозвонкового диска	45
2.5. Методы исследования культур клеток межпозвонкового диска	46
2.6. Статистическая обработка результатов	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	53

3.1. Комплексный анализ диффузионного транспорта и микроструктуры межпозвонкового диска	53
3.2. Исследование влияния провоспалительных цитокинов на клетки межпозвонкового диска	67
3.2.1. Анализ уровня секреции цитокинов при сокультивировании клеток линии ТНР-1 и клеток межпозвонкового диска	67
3.2.2. Исследование продукции лактата клетками межпозвонкового диска под воздействием провоспалительных цитокинов.....	72
3.2.3. Исследование синтетической активности клеток межпозвонкового диска под воздействием провоспалительных цитокинов.....	77
3.2.4. Иммуноцитохимическое исследование клеток межпозвонкового диска под воздействием провоспалительных цитокинов.....	81
3.3. Исследование влияния костных морфогенетических белков-2, -7 и -14	87
на клетки межпозвонкового диска	87
3.3.1. Исследование пролиферативной активности клеток межпозвонкового диска при воздействии костных морфогенетических белков.....	87
3.3.2. Оценка нутритивного статуса и метаболизма клеток межпозвонкового диска при воздействии костных морфогенетических белков.....	91
3.3.3. Исследование синтетической активности клеток межпозвонкового диска при воздействии костных морфогенетических белков.....	95
3.4.3. Иммуноцитохимическое исследование клеток межпозвонковго диска	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ.....	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Остеохондроз позвоночника и дегенеративно-дистрофические процессы в межпозвонковом диске (МПД) в настоящее время являются одной из основных причин снижения трудоспособности населения в мире (Andersson G.B., 1999; Murray C.J.L. et al., 2012; Hoy D. et al., 2014). Около 80 % населения земного шара не менее одного раза в течение жизни испытывали боль в пояснице, что является одной из наиболее частых причин обращения к врачу в развитых странах (Chou R., 2014), при этом частота поражения МПД колеблется от 80 до 85 % (Luoma K et al., 2000; Sprouse R., 2012; Teraguchi M. et al., 2014). Дегенерация МПД считается необратимым процессом и определяется как «аномальный клеточный ответ на прогрессирующую структурную недостаточность» (Adams M.A., Roughley P.J., 2006) с сопутствующими факторами, способствующими ее развитию: ограниченный транспорт питательных веществ (Roberts S. et al., 1996; Urban J.P. et al. 2004), длительная чрезмерная физическая нагрузка (Lotz J.C., Colliou O.K., 1998; Iatridis J.C. et al., 2006), генетическая предрасположенность (Virtanen I.M. et al., 2007; Martirosyan N. et al., 2016), а также хроническое воспаление (Risbud M.V., Shapiro I.M., 2014). Среди провоспалительных цитокинов, обнаруживаемых в дегенерированных МПД, особое значение отводится ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17 (Le Maitre C.L. et al. 2005; Weiler C. et al., 2005; Lee S. et al., 2009; Risbud M.V., Shapiro I.M., 2014). Однако остаются не до конца изученными механизмы влияния провоспалительных цитокинов на метаболизм и питание клеток МПД. Считается, что воспалительный процесс может играть одну из основных ролей в дегенерации МПД, способствовать изменению клеточного фенотипа, что ведет к дисбалансу между катаболическими и анаболическими процессами, наблюдаемому при дегенерации МПД (Seguin C.A. et al. 2005; Le Maitre C.L. et al. 2007).

Консервативное лечение дегенеративных процессов МПД преимущественно направлено на снятие острого болевого синдрома и является симптоматическим. Хирургическое лечение требуется чаще на последних стадиях дегенерации, сопряжено с рисками инвазивного вмешательства и в некоторых случаях ведет к изнашиванию смежных МПД из-за послеоперационных изменений в биомеханике позвоночника (Симонович А.Е. и соавт., 2005; Maldonado C.V. et al., 2011). В связи с этим, актуальным и перспективным направлением исследований в настоящее время является поиск патогенетически обоснованных подходов к регенерации МПД, в частности терапия факторами роста, генная терапия, клеточная терапия и тканевая инженерия (Kepler C.K. et al., 2011; Moriguchi Y., 2016). Одной из основных научных проблем в аспекте регенеративной терапии МПД является аваскулярность ткани МПД и сопряженные изменения транспорта питательных и лекарственных веществ при дегенерации (Huang Y.-C., 2014), что негативно влияет на результаты лечения (Jackson A.R., 2012). Присутствие провоспалительных цитокинов в дегенерированных МПД усиливает деградацию матрикса и замедляет темпы его накопления, тем самым мешая попыткам эндогенной регенерации МПД (Seguin C.A. et al., 2005; Wang J. et al., 2011; Tian Y. et al., 2013).

Важным аспектом в лечении или предотвращении дегенерации МПД является восстановление способности диска синтезировать полноценный внеклеточный матрикс, богатый протеогликанами и коллагенами. С позиции перспектив регенерации МПД получили повышенный интерес исследования экспрессий молекул, которые меняют баланс катаболизма и анаболизма внеклеточного матрикса. В частности, изучаются эффекты надсемейства трансформирующего фактора роста- β (ТФР- β), состоящего из ряда пептидов, которые, как полагают, связаны с синтезом коллагена и протеогликанов и играют важную роль в накоплении межклеточного матрикса. К ТФР- β относятся в том числе и костные морфогенетические белки (КМБ) -2, -7, -14 (Than K.D. et al., 2012; Belykh E. et al., 2015). Как было показано *in vitro* и на животных моделях, на ранней стадии дегенеративного процесса факторы роста стимулируют экспрессию компонентов межклеточного матрикса функционально активными клетками МПД

и запускают механизмы саногенеза, что может способствовать в дальнейшем восстановлению структуры и функции МПД (Masuda K. and An H.S., 2006). При этом закономерности изменения нутритивного транспорта МПД до сих пор остаются недостаточно изученными.

Цель исследования: исследовать изменения морфофункциональной характеристики клеток неповрежденных и дегенерированных межпозвонковых дисков (МПД) под воздействием провоспалительных цитокинов и костных морфогенетических факторов роста в эксперименте для определения механизмов патогенеза дегенерации МПД

Задачи исследования:

1. Установить взаимосвязь между диффузионным транспортом растворенных веществ в МПД человека и его микроструктурной организацией
2. Определить уровень потребления глюкозы и продукции лактата клетками неповрежденных и дегенерированных МПД, культивированных в условиях добавления костных морфогенетических белков и провоспалительных цитокинов
3. Оценить пролиферативную активность клеток неповрежденных и дегенерированных МПД, культивированных в условиях добавления костных морфогенетических белков
4. Определить уровень экспрессии гликозаминогликанов (ГАГ) как основных компонентов межклеточного матрикса МПД в культуре клеток
5. Выявить морфологические изменения клеток неповрежденных и дегенерированных МПД, культивированных в условиях добавления костных морфогенетических белков и провоспалительных цитокинов
6. Обосновать принципы профилактики и коррекции дегенерации МПД

Научная новизна работы

Впервые изучена связь между диффузионным транспортом и микроструктурной организацией внеклеточного матрикса МПД человека. Определены особенности распределения коэффициента диффузии в различных отделах МПД: диффузионный транспорт в области пульпозного ядра (ПЯ), задних

отделов фиброзного кольца (ФК), а также в области замыкательной пластинки на уровне задних отделов ФК в значимой степени ассоциирован с клеточной плотностью.

На основе количественного анализа показаны различия в продукции лактата неповрежденными и дегенерированными клетками ФК и ПЯ. Новыми являются сведения об увеличении продукции лактата клетками МПД при сокультивировании с макрофагоподобными клетками линии ТНР-1; таким образом, впервые объективно установлены патогенетические механизмы влияния провоспалительных цитокинов на изменения потребности в питательных веществах клетками МПД.

Впервые в эксперименте при исследовании влияния КМБ-2, КМБ-7 и КМБ-14 на динамику пролиферативной активности клеток ПЯ и ФК неповрежденного и дегенерированного МПД установлено, что данные КМБ не оказывают выраженного влияния на пролиферацию неповрежденных клеток МПД, незначительно увеличивая пролиферацию дегенерированных клеток ПЯ. Изучено влияние КМБ на нутритивный статус дегенерированных и неповрежденных клеток МПД и установлено отсутствие изменений в потреблении глюкозы и продукции лактата клетками МПД, позволяющее определить перспективные технологии профилактики и лечения дегенерации МПД.

Впервые с использованием сканирующей лазерной конфокальной микроскопии показано, что морфологические изменения дегенерированных и неповрежденных клеток МПД в трехмерной модели при сокультивировании с макрофагоподобными клетками линии ТНР-1 соответствуют изменениям, наблюдаемым в дегенерированном МПД человека.

Разработаны концептуальные схемы патогенеза дегенерации МПД и саногенеза данной патологии с использованием КМБ-2, -7 и -14.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные дополняют представления о влиянии микроструктуры и клеточного состава различных отделов межпозвонкового диска на показатели нутритивного транспорта.

Результаты исследования углубляют знания о молекулярно-клеточных механизмах патогенеза дегенеративного процесса МПД, в частности о влиянии различных провоспалительных цитокинов и КМБ-2, -7, -14 на регуляцию потребления глюкозы клетками МПД *in vitro*. Значения потребления глюкозы и выделения лактата клетками могут быть использованы в дальнейшем для моделирования процессов регенерации и дегенерации МПД. Полученные результаты экспериментально обосновывают механизмы регенеративной терапии МПД. Основные положения исследования могут служить основой для разработки новых методов клеточной терапии и технологий регенерации МПД.

Доказана практическая возможность моделирования воздействия комплекса провоспалительных цитокинов на модели сокультивирования клеток МПД в трехмерной культуре с макрофагоподобными клетками линии ТНР-1.

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедрах нормальной физиологии, патологической физиологии и клинической лабораторной диагностики, нейрохирургии и инновационной медицины ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедре физиологии и психофизиологии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» Минздрава России, кафедре травматологии, ортопедии и нейрохирургии «Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования» – филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России при подготовке студентов, ординаторов, аспирантов и усовершенствовании практических врачей.

Методология и методы исследования

Клинический этап исследования включал клинико-анамнестические и инструментальные методы исследования, гистологический и иммуногистохимический методы, а также морфометрию. Экспериментальное исследование проведено с использованием клеточных культур ПЯ и ФК неповрежденного и дегенерированного МПД человека, а также моноцитоподобных клеток линии ТНР-1. В экспериментальном исследовании

использованы методы культивирования клеток, гистологический, иммуноцитохимический и спектрофотометрический методы, морфометрия. Дизайн диссертационного исследования соответствует принципам надлежащих лабораторной и клинической практик (ГОСТ Р 53434-2009 и ГОСТ Р 52379-2005). Статистические методы исследования применялись для обработки массива полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Диффузионный транспорт в области пульпозного ядра, фиброзного кольца и замыкательной пластики межпозвонкового диска ассоциирован с показателем клеточной плотности, при этом при значении КД ПЯ менее $15 \cdot 10^{-4}$ мм²/с в ткани МПД определяются морфологические и иммуногистохимические признаки дегенерации.
2. Под воздействием провоспалительных цитокинов продукция лактата увеличивается как неповрежденными, так и дегенерированными клетками МПД. Костные морфогенетические белки-2, -7, -14 не оказывают существенного влияния на изменение потребления глюкозы и продукции лактата клетками МПД, а также на пролиферацию клеток МПД.
3. Провоспалительные цитокины оказывают негативное влияние на синтез ГАГ как неповрежденными, так и дегенерированными клетками МПД, являясь важным звеном в патогенезе прогрессирования дегенерации МПД.
4. При трехмерном культивировании клеток МПД под влиянием провоспалительных цитокинов наблюдаются морфологические признаки, характерные для дегенерации МПД человека: наличие кластеров клеток, увеличение ядерно-цитоплазматического индекса, наличие выпячиваний клеточной стенки и отпочковывания цитоплазмы, что является важным фактором адаптации клеток МПД и реакции на неблагоприятные воздействия.

Степень достоверности результатов

Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом исследований, выполненных с использованием современных методов, сертифицированного оборудования и реактивов. Используемые в диссертации методы и дизайн согласуются с исследованиями сравнимого типа, опубликованными в научной литературе по данной тематике. Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью пакета современных статистических компьютерных программ.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на Научно-практической конференции с международным участием «Молекулярные и гистоморфологические особенности дегенеративных процессов в межпозвонковых дисках» (Иркутск, 2015), Научно-практической школе молодых ученых и нейрохирургов с международным участием "Хирургия шейного отдела позвоночника: современные тенденции и основные направления развития" (Москва, 2016), XXIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии-2017» (Санкт-Петербург, 2017), VIII съезде межрегиональной ассоциации хирургов-вертебрологов России с международным участием и IV съезде дорожных нейрохирургов "Фундаментальные и прикладные аспекты поражений и повреждений позвоночника" (Иркутск, 2017), XVII конгрессе европейской ассоциации неврологических хирургов (Венеция, Италия, 2017), Ежегодной конференции биомедицинского инженерного общества «Инженерная персонализированная медицина и терапия» (Финикс, США, 2017), IV Международном научном спинальном симпозиуме ассоциации спинального научного общества Филадельфии и ортопедического научного общества (Лэйк-Хармони, США, 2017), Ежегодном съезде американской ассоциации неврологических хирургов (Лос-Анджелес, США, 2017; Новый Орлеан, США, 2018), 6-м Японско-Российском нейрохирургическом симпозиуме (Фукуи, Япония, 2018 г.), Конгрессе Евроспайн 2018 (Барселона, Испания, 2018), а также на

заседаниях центральной проблемной комиссии и ученого совета ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Личное участие автора

Проведена самостоятельная работа с источниками отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования, их обобщение и оформление в виде обзора литературы, сформулированы научные гипотезы, цель и задачи работы, спланированы эксперименты. Личный вклад автора заключается в получении исходных данных, обработке и интерпретации полученных данных, апробации результатов исследования, подготовке публикаций. В работе, выполненной в соавторстве, вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования. Все главы диссертации написаны автором самостоятельно.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 19 печатных работ, из которых 8 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК Минобразования и науки РФ и 10 – в ведущих рецензируемых изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертация представлена в виде рукописи, изложена на 138 страницах машинописного текста, включает введение, 3 главы, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, а также список литературы. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 34 рисунками. Список литературы включает в себя 254 источника, в том числе 20 на русском и 234 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности строения и биологии межпозвонкового диска

МПД – это высокоспециализированное аваскулярное, аневральное образование, состоящее из трех основных структурных компонентов: центрально расположенного пульпозного ядра (ПЯ), ограничивающего его по периферии фиброзного кольца (ФК) и замыкательных пластинок (Рисунок 1).

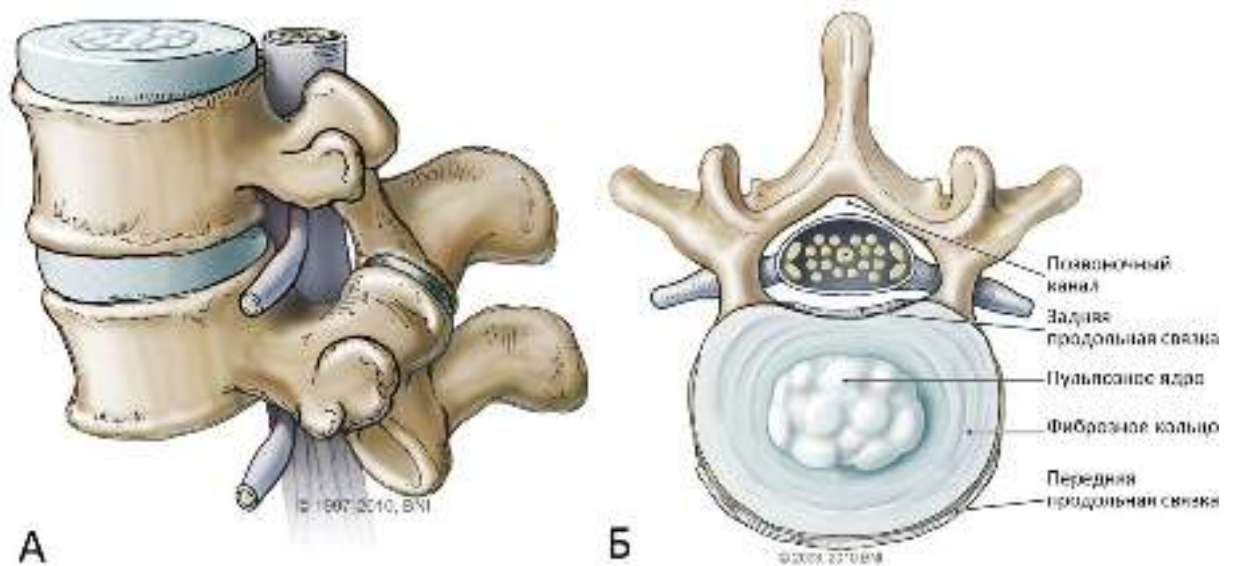


Рисунок 1 – Расположение и структура нормального взрослого межпозвонкового диска: А – сагиттальный вид; Б – аксиальный вид (использовано с разрешения Неврологического института Барроу)

ФК состоит из 15-25 концентрических колец, или ламелл (Marchand F., Ahmed A.M., 1990; Walker M.H., Anderson D.G., 2004), образованных параллельными коллагеновыми фибриллами I типа, окруженными эластиновыми волокнами. Волокна коллагена ориентированы на 65° по отношению к оси позвоночника, а волокна соседних ламелл имеют противоположное направление, увеличивая таким образом механическую прочность МПД и препятствуя распространению повреждения ФК (Schollum M.L. et al., 2009). Клетки ФК, особенно внешней его части, фибробластоподобные, тонкие, удлиненной формы и

расположены параллельно коллагеновым волокнам (Errington R.J. et al., 1998; Hastreiter D. et al., 2001). Ближе к внутренней части они приобретают овальную форму (Diwan A.D. et al., 2000; Raj P.P., 2008). Часть клеток ФК характеризуется наличием длинных тонких цитоплазматических выступов, которые могут достигать 30 мкм и более. Такие же отростки встречаются и у клеток ПЯ. Их функция неизвестна, но есть предположение, что они выполняют сенсорную и коммуникативную роли (Errington R.J. et al., 1998).

ПЯ представляет собой желатиноподобную сердцевину МПД, состоящую из беспорядочно расположенных коллагеновых и радиально пролегающих эластиновых волокон, погруженных в высокогидратированный агрекансодержащий гель (Adams M.A., Roughley P.J., 2006; Raj P.P., 2008). Высокое содержание протеогликана приводит к высокой плотности отрицательно заряженных молекул. Притягивая воду и другие положительные ионы, эта фиксированная плотность заряда обеспечивает высокое содержание воды в ПЯ. Погруженные в матрикс, клетки ПЯ имеют хондроцитоподобную структуру, располагаются по отдельности, иногда они заключены в капсулу в виде изогенных групп (Urban J.P. et al., 2004).

Замыкательные пластинки являются морфологическим субстратом соединения тел позвонков и МПД и представляют собой слой гиалинового хряща около 1 мм толщиной (Humzah M., Soames R., 1988; Moore R.J., 2000). Замыкательные пластинки состоят из относительно большого по сравнению с ПЯ количества клеток и межклеточного матрикса – преимущественно из коллагена II типа и протеогликанов (Бенгус Л.М., 2012). Благодаря активно протекающим процессам диффузии молекул через хрящевые замыкательные пластинки осуществляется питание МПД.

МПД является самой крупной бессосудистой структурой в организме человека, получая все питательные вещества через тела соседних позвонков и окружающие ФК ткани (Fagan A. et al., 2003; Nerlich A.G. et al., 2007). Внутрикостные артерии тел позвонков берут начало от периостальных или непосредственно от поясничных артерий. Кровеносные сосуды, отходящие от

внутрикостных артерий, пронизывают субхондральную и гиалиновую составляющие замыкательных пластин МПД и формируют плотную капиллярную сеть в проекции ПЯ. С возрастом плотность данной сосудистой сети уменьшается (Bernick S., Cailliet R., 1982; Chandraraj S. et al., 1998). Мельчайшие капилляры также обнаружены по периферии ФК, проникая в него на глубину 1-2 ламеллей (Nerlich A.G., 2007).

Клетки МПД взаимодействуют друг с другом и с окружающим внеклеточным матриксом, который производится и постоянно обновляется самими же клетками диска. Межклеточный матрикс МПД состоит преимущественно из воды и коллагенов различных типов, протеогликанов, неколлагеновых протеинов и эластинов. В молодом возрасте ПЯ примерно на 90 % состоит из воды, однако к шестидесяти годам водная составляющая снижается до 70 %. В то же время ФК состоит на 65-75 % из воды, и с возрастом эта цифра значительно не изменяется (Таблица 1).

Протеогликаны являются высокомолекулярными соединениями, состоящими из волокнистого центрального белка с ковалентно присоединёнными полисахаридными цепями – гликозаминогликанами (ГАГ). В МПД наиболее часто встречаются сульфатированные ГАГ, такие как хондроитинсульфат и кератансульфат, или кератосульфат. В МПД представлены два класса протеогликанов: крупные (агреканы и версиканы) и малые (бигликаны, декорины, фибромодулины и люмиканы). Крупные протеогликаны играют важную роль в удержании воды в ткани диска, а то время как малые протеогликаны участвуют в регуляции обмена внеклеточного матрикса (Cs-Szabo G. et al., 2002). Функции МПД, такие как механические нагрузки и обеспечение осмотического давления, тесно связаны с содержанием агрекана. (Iozzo R.V., Schaefer L., 2015). В целом, содержание протеогликанов выше в ПЯ, чем в ФК. С возрастом структура агрекана меняется: возрастает количество цепей кератансульфатов и снижение количества хондроитинсульфатов (Дедух Н.В., 2012).

Таблица 1 – Состав основных компонентов межпозвонкового диска (Antoniou J. et al., 1996; Raj P.P., 2008; O’Connell G.D. et al., 2015; Wu Y. et al., 2015)

Компоненты	Пульпозное ядро	Фиброзное кольцо, внешняя часть	Фиброзное кольцо, внутренняя часть	Замыка- тельная пластинка	МПД в целом
Вода (% общего веса)	70-90 %	65-75 %	75-80 %	72-80 %	65-90 %
Коллагены (% сухого веса)	15-25 %	75-85 %	40-70 %	25 %	15-65 %
Протеогли- каны (% сухого веса)	20-60 %	10 %	20-35 %	8 %	15-65 %
Другие белки (% сухого веса)	15-55 %	5-15 %	5-40 %	нет данных	нет данных

Коллагены представляют узкоспециализированное суперсемейство, включающее 28 генетически различных типов (Ricard-Blum S., 2011), 9 из которых присутствуют в зрелом МПД (Eyre D.R. et al, 2002). Коллагеновая сеть МПД формируется в основном из коллагена I типа, что составляет около 70% от сухого веса ФК, и коллагена II типа, приспособленного к несению компрессионных нагрузок, который располагается в ПЯ и внутренней части ФК. Небольшие количества коллагенов III, V, VI, IX, XI и XIV типов образуют гибридные фибриллы с I и II типами коллагена, обеспечивая прочность МПД. Представляя собой механически упругую сеть, коллагены поддерживают клетки, а также ограничивают агрегаты гидратированных протеогликанов в пределах своей сети, помогая молекулам протеогликанов сопротивляться сжимающим нагрузкам (Schmidt M.V. et al., 1990).

Основным условием нормальной физиологии МПД считается баланс между анаболическими и катаболическими факторами (An H.S. et al., 2006; Grunhagen T.

et al., 2006). В поддержании этого динамического равновесия принимают участие такие факторы как кровоснабжение, клеточный метаболизм, цитокины, факторы роста, протеиназы, ингибиторы протеиназ и механическая нагрузка на МПД (Masuda K., 2008; Chan W.S. et al., 2011). Межклеточный матрикс является динамической структурой. Баланс между синтезом, накоплением и разрушением матричных макромолекул определяет качество и целостность межклеточного вещества и, таким образом, механические свойства различных отделов МПД. Целостность межклеточного матрикса имеет важное значение для поддержания относительно асептического и аневрального характера здорового диска. При нарушении баланса либо за счет увеличения скорости деградации, либо за счет снижения темпов производства, снижается количество функционирующих макромолекул матрикса. Возникающие изменения в количественном составе и качестве межклеточного матрикса диска ведут к нарушению в обмене веществ клеток, населяющих МПД (Huang Y.C. et al., 2014).

Основными факторами, оказывающими анаболический эффект на клетки МПД, являются инсулиноподобный фактор роста, трансформирующий фактор роста β и костные морфогенетические белки (КМБ) (An H.S. et al., 2006). Данные факторы изменяют гомеостаз МПД в сторону анаболизма, увеличивая синтез компонентов межклеточного матрикса.

Разрушение макромолекул межклеточного матрикса происходит за счет действия ряда субстрат-специфичных ферментов, синтезируемых клетками МПД. Установлено три семейства ферментов, участвующих в деградации межклеточного матрикса МПД: матриксные металлопротеиназы (ММП), семейство дезинтегринов и адамализинов с тромбоспондиновым модулем (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS) и катепсины (Roberts S. et al., 2000; Weiler C. et al., 2002; Le Maitre C.L. et al., 2004). В разрушении агрекана, основного протеогликана межклеточного вещества, принимают участие представители семейства ADAMTS (Sivan S.S. et al., 2014), в частности фермент агреканаза-1, также известный как ADAMTS-4 (Le Maitre C.L. et al., 2007). Установлен ряд ММП внеклеточного матрикса МПД животных и человека: ММП-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -

13, -19 и -28. (Roberts S. et al., 2000; Molinos M. et al., 2015). Кроме ММП, расщеплять различные типы коллагена и протеогликаны способна другая группа протеиназ - катепсины. Они включают в себя аспартатные (катепсин D), сериновые (катепсины А и G) и цистеиновые протеиназы (катепсины В, Н, К, L и S), которые накапливаются в лизосомах хондроцитов и секретируются в межклеточное пространство. Установлено, что сериновая протеиназа HTRA1 разрезает протеогликаны в специфичной локализации, характерной для дегенерации МПД, и ее количество в ткани коррелирует со степенью дегенерации (Akhatib B. et al., 2013). Несмотря схожесть субстратов ММП и катепсинов, ММП активны только при нейтральном рН, а катепсины проявляют максимальную активность в кислой среде. На основании этого свойства катепсинов имеются предположения о их важном значении на поздних стадиях дегенерации МПД, когда накопление лактата вызывает образование кислой среды (Nagase H. et al., 2008; Васильева И.Г. и др., 2010). Таким образом, баланс протеаз и их ингибиторов имеет важное значение для поддержания гомеостаза МПД.

1.2. Некоторые аспекты питания межпозвонкового диска и его нарушение

Поскольку ткани МПД являются крупнейшей аваскулярной тканью в организме человека, транспорт питательных веществ имеет решающее значение для поддержания здоровья диска. Питательные вещества, поступающие в МПД опосредованно через капиллярную сеть в субхондральных и гиалиновых пластинках и микрососуды наружной части ФК, проходят через межклеточный матрикс и достигают клеток, некоторые из которых находятся на значительном расстоянии от ближайшего кровеносного сосуда – до 7-8 мм, как в центральной части ПЯ (Urban J.P., 2004; Huang Y.-C. et al., 2014) (Рисунок 2). Изменения в кровотоке питающих МПД сосудов может оказывать непосредственное влияние на развитие дегенерации МПД (Кобызев А.Е., 2012). Так, установлена значимая корреляция между снижением кровотока в поясничных артериях и уменьшением диффузии в диске, характерной для дегенерации МПД, измеренной с помощью

диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии (МРТ) (Kurunlahti M. et al, 2001; Tokuda O. et al, 2007).

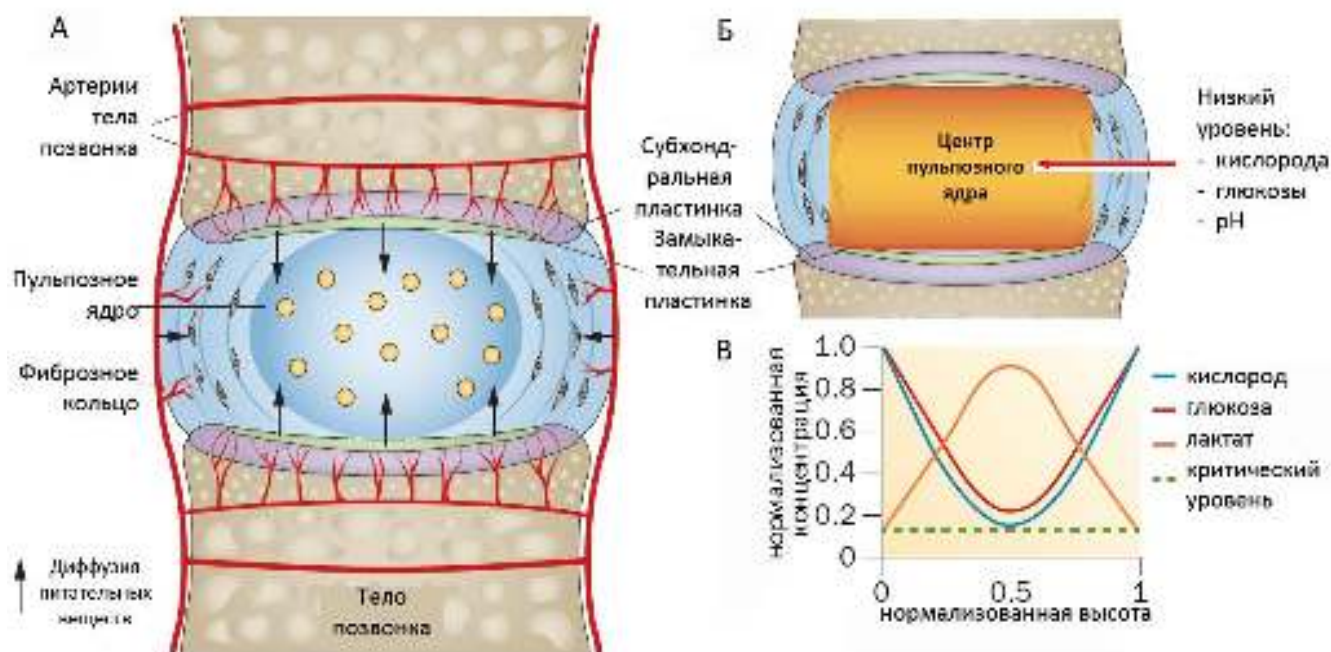


Рисунок 2 – Особенности транспорта питательных веществ в нормальном межпозвонковом диске: А – кровоснабжение межпозвонкового диска через капилляры субхондральной пластины и хрящевой концевой пластинки и наружной части фиброзного кольца; Б – центр пульпозного ядра имеет самые низкие уровни питательных веществ и самую высокую концентрацию метаболитов; В – схема нормализованных градиентов концентрации глюкозы, кислорода и лактата по высоте пульпозного ядра и замыкательной пластинки (адаптировано с Huang Y.-C. et al., 2014)

Замыкательная пластинка считается первым этапом на пути прохождения питательных веществ в МПД. Математическое моделирование транспорта в МПД методом конечных элементов показало, что пористость концевой пластинки оказывает значительное влияние на диффузионный транспорт кислорода, глюкозы и лактата в МПД (Selard E. et al, 2003; Malandrino A. et al., 2014), что подтверждается данными электронной микроскопии (Wu Y. et al., 2016).

Кальцификация замыкательной пластинки наблюдается с возрастом, но механизмы развития этого процесса до сих пор остаются неизученными (Moore R., 2006).

Внутри самого МПД перенос питательных веществ и выведение продуктов обмена определяется пассивной диффузией, хотя ряд авторов приводят данные об участии в нутритивном транспорте в том числе и индуцированной конвекции, которая поддерживается за счет нормальной механической нагрузки позвоночника (Garcia A.M. et al., 1996; Ferguson S. et al., 2004; Gullbrand S.E. et al., 2015; Giers M.V. et al., 2017). Баланс между скоростью диффузии растворенных веществ через межклеточный матрикс и скоростью их потребления клетками определяет градиент концентрации внутри диска.

Диффузия питательных веществ внутрь диска определяется не только свойствами замыкательной пластинки, но также свойствами его межклеточного матрикса и растворённых веществ. Полианионный протеогликан, высокое содержание которого отмечено в матриксе МПД, действует как селективный барьер проницаемости и приводит к усиленному исключению анионов из МПД. Катионы легче проникают в МПД (Urban J.P., 2004). Относительное исключение поступления анионных растворенных веществ в диск имеет практическое приложение. В частности, обнаружено, что отрицательно заряженные антибиотики, такие как пенициллин и цефуроксим, проникают в МПД гораздо менее эффективно, чем положительно заряженные, такие как аминогликозиды (Thomas R.W. et al., 1995; Tai C.C. et al., 2002). Размер молекул также влияет на способность их диффузии в диске: коэффициент диффузии в МПД уменьшается с увеличением молекулярной массы молекулы, затрудняется прохождение крупных молекул, в том числе факторов роста, ингибиторов протеаз и даже глюкозы (Jackson A.R., Gu W.Y., 2009). Малые молекулы диффундируют свободно в центр диска, в то время как диффузия для молекул с молекулярной массой, превышающей 1 кДа, резко снижается (Ferguson S., 2004). При исследовании контрастных веществ, используемых для МРТ исследования МПД установлено, что диффузия гадопентетата димеглумина, молекулярная масса которого 546 Да, значительно выше, чем высокомолекулярного гадолиния полилизина

(молекулярная масса – 40 кДа) (Perlewitz E.T. et al., 1997). Поскольку содержание протеогликанов в ПЯ выше, чем в ФК, крупные и негативно заряженные молекулы успешнее проникают в ФК (Urban J.P., 2004).

Наиболее важным метаболическим процессом, обеспечивающим жизнеспособность клеток МПД, является гликолиз (Ishihara H., Urban J.P., 1999; Bibby S.R. et al., 2004): на каждую потребленную молекулу глюкозы синтезируются 2 молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) и 2 молекулы лактата. Условия для жизни клеток в МПД достаточно суровы: низкий рН в связи с высокой концентрацией лактата, гипоксия, низкий уровень глюкозы, а также постоянное механическое напряжение. Жизнеспособность клеток МПД падает при концентрации глюкозы ниже 0,5 ммоль/л в течение трех суток (Horner H.A., Urban J.P., 2001; Bibby S.R. et al., 2004). По данным R.A. Windhaber и соавт. (2003), хондроциты начинают умирать в течение двадцати четырех часов при концентрации глюкозы ниже 0,2 ммоль/л. Уровень рН также влияет на состояние клеток МПД: даже при адекватном уровне глюкозы кислая среда отрицательно влияет на жизнеспособность клеток. В неповрежденном диске рН варьируется в значениях 7,1-7,4 (Grunhagen T. et al. 2006), снижаясь в центральной части диска из-за более высокой концентрации молочной кислоты (Urban J.P., 2002). При слабой степени дегенерации МПД рН снижается до значений 6,5-6,8, а при тяжелой степени – до 5,7 (Gilbert H.T. et al., 2016). Кислород необходим для клеточной активности, хотя и не является необходимым для выживания: клетки МПД остаются жизнеспособными при полном отсутствии кислорода на протяжении многих дней *in vitro* (Bibby S.R.S., Urban J.P.G., 2004; Risbud M.V. et al., 2010), что еще раз доказывает, что клетки МПД продуцируют АТФ преимущественно путем анаэробного гликолиза. Эксперименты *in vitro* показывают, что хронический недостаток кислорода приводит к снижению продукции межклеточного матрикса и клеточной активности в целом (Ishihara H., Urban J.P., 1999; Horner H.A., Urban J.P., 2001), в то время как при хроническом недостатке глюкозы клетки гибнут. В ходе исследований *in vitro* установлено, что активность клеток МПД и скорость продукции внеклеточного матрикса зависят от концентрации

внечелочного кислорода и рН. Так, самый высокий темп синтеза элементов матрикса отмечается на уровне кислорода около 5% (Ishihara H., Urban J.P., 1999). Однако, как только уровень кислорода падает ниже 5%, синтез значительно уменьшается. Также синтез внечелочного матрикса резко снижается при рН менее 6 (Ohshima H., Urban J.P., 1992). В противоположность этому, деградация макромолекул матрикса вне клеток менее чувствительна к рН. Таким образом, слабощелочная рН вызывает увеличение дегенерации матрикса преимущественно путем ингибирования синтеза, а не ускорением деградации (Razaq S. et al., 2003). Снижение поступления питательных веществ к клеткам МПД, снижение напряжения кислорода в ткани и низкий рН влияют на способность клеток МПД синтезировать и поддерживать внечелочный матрикс МПД, что в конечном счете ведет к развитию дегенеративной патологии.

Исследования особенностей метаболизма в ПЯ и ФК указывают на различия энергетического метаболизма между клетками этих двух структур МПД (Fernando H.N. et al., 2011; Salvatierra J.C. et al., 2011; Cisewski S.E. et al., 2016), что предполагает наличие различий в биохимических способах производства энергии. Клетки ПЯ потребляют меньше глюкозы и вырабатывают гораздо больше АТФ, нежели клетки ФК (Wang C. et al., 2013). Считается, что различия между клетками ПЯ и ФК связаны с различным эмбриональным происхождением тканей МПД (Pattappa G. et al., 2012). ПЯ развивается из хорды, тогда как ФК и замыкательные пластинки развиваются из мезенхимы (Hunter C.J. et al., 2004; Zhao C.Q. et al., 2007). ПЯ содержит нотохордальные клетки в раннем возрасте, которые затем с возрастом исчезают (Hunter C.J. et al., 2004; Rodrigues-Pinto R. et al., 2014).

Нарушение поступления питательных веществ считается важным фактором в прогрессировании дегенерации МПД. Предполагается, что это происходит, главным образом, за счет снижения поступления веществ через капилляры костных и хрящевых замыкательных пластинок МПД вследствие их интенсивной кальцификации (Urban J.P., 2004; Benneker L.M. et al., 2005). Однако в недавних исследованиях показано, что изменения в архитектуре концевой пластинки не могут существенно повлиять на транспорт веществ в МПД, который в

значительной степени определяется диффузией. Так, на основании измерения минеральной плотности в субхондральной пластинке было установлено отсутствие взаимосвязи между ее склерозом и степенью дегенерации (Wang Y.M. et al., 2011). В другой работе на основании микроКТ-исследования субхондральных пластинок и моделирования пороэластического транспорта не удалось выявить взаимосвязи между изменением проницаемости пластинки и концентрациями кислорода и лактата в МПД (Malandrino A. et al., 2014).

В своей работе мы использовали новый метод исследования МПД - диффузионно-взвешенная (ДВ) МРТ, которая позволяет на клеточном уровне оценить состояние ткани путем мониторинга движения свободных молекул воды и растворенных в ней веществ (Бывальцев и соавт., 2016). Посредством построения карт ДВ изображений возможен анализ тех минимальных изменений ткани, которые не обнаруживаются на рутинных T1- или T2-взвешенных изображениях МРТ. ДВ МРТ является неинвазивной процедурой: контраст полученных изображений достигается при помощи градиента магнитного поля и не требует инъекции контрастного вещества. При этом степень диффузии представлена в виде измеряемого коэффициента диффузии (КД). Совокупность полученных значений КД каждого вокселя образует функциональную диффузионную карту, которая позволяет комплексно оценить функциональное состояние молекулярной диффузии МПД (Kealey S.M. et al., 2005; Niinimaki J. et al., 2009).

Таким образом, МПД представляет собой уникальную с позиции нутритивного транспорта структуру. Изменения в нутритивном статусе играют важную роль в развитии и прогрессировании дегенерации МПД.

1.3. Современные представления о патогенезе дегенерации межпозвонкового диска

Дегенерация МПД считается необратимым процессом и определяется как «аномальный клеточный ответ на прогрессирующую структурную недостаточность» (Adams M.A., Roughley P.J., 2006) с факторами,

способствующими ее развитию: ограниченный транспорт питательных веществ (Urban J.P. et al., 2004; Huang Y.-C. et al., 2014), длительная чрезмерная физическая нагрузка (Lotz J.C. et al., 1998; Iatridis J.C., MacLean J.J., 2006), генетическая предрасположенность (Virtanen I.M. et al., 2007, Martirosyan N. et al., 2016), а также хроническое воспаление (Risbud M.V., Shapiro I.M., 2014).

Биологически дегенерация МПД ассоциируется со снижением количества клеток, уменьшением их пролиферации, увеличением апоптоза и старением клеток, а также с измененным метаболизмом клеток МПД, характеризующимся преобладанием процессов катаболизма над процессами анаболизма и усилением экспрессии провоспалительных цитокинов (Seguin C.A. et al., 2005; Le Maitre C.L. et al., 2007; Risbud M.V., Shapiro I.M., 2014).

Наиболее значительные микроструктурные изменения матрикса при дегенерации диска касаются протеогликанов (Дедух Н.В., 2012), вследствие чего происходит снижение гидратации МПД с последующим нарушением его механической функции: менее гидратированное ПЯ теряет способность равномерно распределять компрессионные силы между телами позвонков, и, как следствие, они переносятся неравномерно на окружающее ФК, дестабилизируя его механические свойства и вызывая дальнейшую структурную дезорганизацию с формированием круговых и радиальных надрывов. Радиальные разрывы ФК со временем прогрессируют в заднюю протрузию МПД или в грыжевое выбухание ПЯ, компримируя нервные окончания, а также спинномозговые корешки, и вызывая тем самым болевые симптомы. С прогрессированием дегенерации исчезает четкая граница между ПЯ и ФК, диск становится фиброзированным (Hangai M et al., 2008). Ткань МПД становится более хрупкой (Huang Y.-C. et al., 2014), в ней происходит усиление пигментации. Таким образом, дегенерация МПД – это процесс, отражающий потерю структурной целостности диска, которая морфологически проявляется снижением высоты диска, образованием внутренних трещин, потерей воды и фиброзированием ПЯ, истончением и обызвествлением замыкательных пластинок, дезорганизацией структуры ФК, неоваскуляризацией и

неоиннервацией тканей диска (Adams M.A., Roughley P.J., 2006; Zhao C.Q. et al. 2007).

Изменения в морфологии клеток при дегенерации МПД изучены менее подробно. Известно, что у взрослого человека количество клеток МПД в 2 раза меньше, чем у ребенка (Guehring T. et al., 2009). Установлено, что для бессимптомно стареющего ПЯ характерно снижение плотности клеток и большое количество некротических клеток (Boos N. et al., 2002). Следовательно, снижение клеточной плотности не является изолированным фактором, обуславливающим развитие процесса дегенерации МПД. Считается, что патогномичным признаком дегенерации МПД являются кластеры пролиферирующих клеток (Johnson W.E. et al., 2001). Исследование W.E.V. Johnson и S. Roberts (2003) предполагает, что преобладание цитоплазматических выступов клеток внутренней части ФК наблюдается чаще при сколиотических изменениях МПД. Еще одной важной особенностью дегенерации МПД является увеличение присутствия других типов клеток, таких как клетки нервных волокон, шванновские клетки, эндотелиальные клетки и фибробласты, ассоциированные с неоваскуляризацией (Boos N. et al., 2002).

1.4. Роль провоспалительных цитокинов и иммунного ответа в дегенерации межпозвонкового диска

Наблюдаемые при дегенерации МПД повышение экспрессии или постоянное присутствие провоспалительных цитокинов с процессами разрушения матрикса диска (Le Maitre C.L. et al., 2005; Bachmeier B.E. et al., 2007; Shamji M.F. et al., 2010) свидетельствуют о важной роли воспаления в дегенерации МПД. Провоспалительные молекулы секретируются как самими клетками ПЯ и ФК (Rand N. et al., 1997; Kepler C.K. et al., 2013; Yamamoto J., et al., 2013), так и макрофагами, Т-клетками и нейтрофилами. Важную роль в продукции провоспалительных медиаторов играют макрофаги (Kim J.H. et al., 2008; Wang J. et al., 2013), присутствие которых в тканях дегенерированных МПД

подтверждается гистологическими исследованиями образцов ткани МПД после хирургического лечения, а также при иммуногистохимической окраске на макрофагальный маркер CD68 (Woertgen C. et al., 2000; Shamji M.F. et al., 2010).

Интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β). Многочисленные исследования показали, что клетки МПД экспрессируют ИЛ-1 α/β , ИЛ-1Ra, ИЛ-1RI и ИЛ-1-конвертирующий фермент, при этом экспрессия ИЛ-1 β и его рецептора ИЛ-1RI возрастает с тяжестью заболевания (Le Maitre C.L. et al., 2005; Phillips K.L. et al., 2013). Повышенные уровни ИЛ-1 β обнаруживаются как в эпидуральном пространстве (Cuellar J.M. et al., 2013), так и непосредственно в дегенерированных МПД (Le Maitre C.L. et al., 2005, 2007). ИЛ-1 β играет большую роль в регулировании деградации матрикса посредством усиления экспрессии ММП-3, ММП-9, ММП-13 и ADAMTS-4, участвующих в разрушении агрекана и коллагенов (Le Maitre C.L. et al., 2007; Pockert A.J. et al., 2009).

Фактор некроза опухоли- α (ФНО- α). Еще одним из ключевых цитокинов, оказывающих мощное провоспалительное действие на МПД, является ФНО- α . ФНО- α и его рецепторы TNFR1 и TNFR2 экспрессируются клетками как здорового, так и дегенерированного МПД (Bachmeier V.E. et al., 2007; Le Maitre C.L. et al., 2007). Синтез ФНО- α увеличивается при дегенерации, коррелируя со степенью ее выраженности (Mern D.S. et al., 2013). Известно, что ИЛ-1 β и ФНО- α стимулируют продукцию субстанции P, фактора роста эндотелия сосудов, фактора роста нервов, нейротрофического фактора роста, и уровни ИЛ-1 β и ФНО- α выше у пациентов с болевым синдромом по сравнению с таковыми без него (Freemont J. et al., 2002, 2009; Abe Y.K. et al., 2007; Ohba Y. et al., 2009; Andrade P. et al., 2011). Уровень ФНО- α также ассоциирован с формированием грыж МПД (Genevay S. et al., 2009; Ohtori S. et al., 2013). В отношении изменения экспрессии TNFR1 при дегенерации МПД встречаются неоднозначные данные. По данным одного исследования, экспрессия TNFR1 снижается (Le Maitre C.L. et al., 2007), в то время как по другим данным – не изменяется (Mern D.S. et al., 2013). Таким образом, не происходит пропорционального увеличения количества рецепторов к ФНО- α , и со временем клетки МПД могут стать менее чувствительными в ответ на ФНО- α . Данная

концепция согласуется с наблюдаемым в других клетках развитием феномена толерантности путем ингибирования экспрессии рецепторов к ФНО, делая их менее восприимчивыми к воздействию ФНО- α .

Интерлейкин-6 (ИЛ-6). ИЛ-6 синтезируется моноцитами, макрофагами, эндотелиальными клетками, фибробластами, активированными Т-клетками, а также рядом клеток, не относящихся к иммунцитам, в том числе и клетками МПД (Rand N. et al., 1997), и является важным цитокином, который может оказывать как провоспалительные, так и противовоспалительные эффекты. Показано, что экспрессия ИЛ-6 повышается как в клетках МПД, так и в хондроцитах суставных хрящей после воздействия на них ИЛ-1 и ФНО- α (Sui Y. et al., 2009). ИЛ-6 обладает продегенеративным эффектом на клетки ПЯ человека, снижая синтез протеогликанов и экспрессию мРНК агрекана и коллагена II типа (Sui Y. et al., 2009). Известно, что ИЛ-6 потенцирует катаболические эффекты ИЛ-1 и ФНО- α на клетки ПЯ (Studer R.K. et al., 2011). При одновременном добавлении ИЛ-6 и растворимой формы его рецептора совместно с ИЛ-1 или ФНО- α к культурам клеток дегенерированного ПЯ человека отмечалось значительное увеличение экспрессии мРНК ММП-3, простагландина E2, циклооксигеназы-2 и снижение синтеза протеогликанов по сравнению с воздействиями ИЛ-1 или ФНО- α в отдельности (Studer R.K. et al., 2011). Таким образом, модуляция уровня ИЛ-6 является важной терапевтической мишенью как для предотвращения деградации матрикса, так и с целью регуляции эффектов ФНО- α .

Интерлейкин-8 (ИЛ-8). Роль ИЛ-8, также известного как хемокин CXCL8 в патологии МПД до конца не изучена. Показано, что *in vitro* клетки ФК дегенерированных МПД продуцируют значительные количества ИЛ-8 спонтанно (Moon H.J. et al., 2014), а также при совместной культивации клеток МПД с макрофагами (Takada T.K. et al., 2012). Повышенное содержание ИЛ-8 отмечено в тканях дегенерированного МПД по сравнению со здоровым и положительно коррелирует с тяжестью дегенерации (Phillips K.L. et al., 2013). ИЛ-8 является мощным хемоаттрактантом для иммунных клеток (de Oliveira S. et al., 2013).

Одной из особенностей регуляторной системы цитокинов является то, что цитокины крайне редко реагируют по отдельности, т.е. клетки-мишени, как правило, подвергаются действию сразу целого комплекса цитокинов. Такая система функционирования цитокинов приводит к формированию многоуровневой сети и каскадной активности. Цитокины обладают плеiotропностью действия, т.е. один и тот же цитокин действует на разные типы клеток, оказывая на них различный эффект (Плотникова М.А., 2014).

Таким образом, провоспалительные цитокины имеют принципиально важную катаболическую роль в модуляции клеточного звена дегенерации МПД. Выделяемые в МПД хемокины стимулируют инфильтрацию и активацию Т- и В-клеток, макрофагов, нейтрофилов и тучных клеток в «иммунопривилегированную» ткань МПД, что сопровождается выделением эпидермального фактора роста, фактора роста нервов и, соответственно, ведет к неоваскулогенезу и вращанию нервных окончаний в МПД (Freemont A.J. et al., 2002; Тарбеева Г.Р., 2015). В эксперименте провоспалительные цитокины часто используются в качестве катаболической среды для изучения дегенеративных каскадов, в том числе на культурах клеток МПД (Wang J., 2011; Walter B.A. et al., 2015). Несмотря на то, что изменение экспрессии множества медиаторов воспаления ассоциировано с дегенерацией МПД, их точные роли в патогенезе этого процесса до конца не определены. С одной стороны, сбалансированный воспалительный ответ может рассматриваться как естественный процесс, необходимый для восстановления функционирования МПД. С другой стороны, воспаление как повреждающий фактор принимает участие в прогрессировании болезни и может расцениваться и как причина, и как следствие дегенерации МПД и грыжеобразования.

1.5. Подходы к регенерации межпозвонкового диска

Хотя консервативная терапия облегчает ранние симптомы проявления дегенерации МПД, в конечном итоге хирургическое лечение требуется почти 4 миллионам человек ежегодно (Brodke D.S., Ritter S.M., 2005). Хирургическое

лечение дегенеративного МПД включает дискэктомию, замену диска протезом и/или хирургическую фиксацию смежных позвонков (Бывальцев В.А. и соавт., 2011, 2014, 2016; Jacobs W.C., 2013). Интерес к биологии МПД значительно вырос за последние два десятилетия, главным образом, благодаря исследованиям, направленным на разработку биологической терапии для восстановления дегенерированных МПД (Alini M. et al., 2002; Sakai D., Grad S., 2015). Для активации регенеративного потенциала МПД используют различные подходы: введение терапевтических агентов, белков-активаторов, различных типов клеток или клеточных популяций, влияющих на биосинтез и деградацию компонентов внеклеточного матрикса, а также методы генной инженерии (Moon S.H. et al., 2008; Бывальцев В.А. и др., 2015; Sakai D., Andersson G.B., 2015; Vo N.V. et al., 2016; Cruz M.A. et al., 2018).

Учитывая, что дегенерация МПД связана в том числе и с прогрессирующим снижением общего числа клеток, предложены многочисленные варианты терапии, направленные на восстановление клеточной популяции диска. Клеточная терапия предполагает использование различных дифференцированных клеток МПД – клеток ПЯ (Ganey T. et al., 2003; Wang W. et al., 2018), клеток ФК (Sato M. et al., 2003; Vedicherla S., Buckley C.T., 2017), а также их клеток-предшественников (Risbud M.V. et al., 2007; Sakai D. et al., 2012). На сегодняшний день терапия стволовыми клетками – это перспективный метод лечения дегенерации диска, а количество исследований в данной области увеличивается с каждым годом (Юхта М.С. и др., 2013; Berebichez-Fridman R. et al., 2017; Lo Monaco M. et al., 2018). В клеточной терапии дегенерации МПД описано применение нескольких видов стволовых клеток взрослого организма: мезенхимальных, полученных из костного мозга, выделенных из жировой ткани, выделенных из мышечной ткани, гемопоэтических, стволовых клеток обонятельных мембран, синовиальных стволовых клеток (Berebichez-Fridman R. et al., 2017).

Важным условием для успеха клеточной терапии МПД является поддержание условий для выживания трансплантированных клеток. Необходимо учитывать аваскулярность МПД и низкую скорость молекулярного транспорта,

которая еще больше снижается с прогрессированием дегенерации МПД. Остаются малоизученными закономерности изменения нутритивного транспорта в МПД. Поддержание адекватных уровней глюкозы и рН легко достигается в культуре клеток в условиях лаборатории, однако не в случае *in vivo*. По состоянию на ноябрь 2016 г., было проведено двадцать клинических исследований, посвященных оценке трансплантации клеток для регенерации МПД (Sakai D., Schol J., 2017), результаты восьми из них опубликованы (Haufe S.M., Mork A.R., 2006; Meisel H.J. et al., 2006, 2007; Yoshikawa T. et al., 2009; Orozco L. et al., 2011; Coric D. et al., 2013; Pettine K.A, et al., 2015; Mochida J. et al., 2015; Elabd C. et al., 2016). В последнем опубликованном клиническом исследовании (Elabd C. et al., 2016) трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, проводилась пяти пациентам с дегенеративным заболеванием МПД. После 4-6-летнего наблюдения все пациенты сообщали об уменьшении болевого синдрома, а четверо из пяти пациентов сообщили о некотором улучшении двигательной активности. У четырех пациентов наблюдалось уменьшение задней протрузии МПД, а у одного пациента, наоборот, отмечалось прогрессирование протрузии МПД. Тем не менее, оценка МРТ показала умеренное снижение высоты диска у четырех из пяти пациентов. Не наблюдалось никаких новообразований или других аномалий. Об изменениях в гидратации дисков не сообщалось.

В ряде других исследований при попытках трансплантации тканеинженерного МПД возникли проблемы с приживаемостью клеток, связанные, вероятно, с аваскулярностью диска и недостаточным транспортом питательных веществ внутрь него (Kandel R. et al., 2008; Yang Q., et al., 2016).

Клетки МПД чувствительны к уровню внеклеточной осмолярности, которая зависит от концентрации агрекана. Потеря агрекана и, следовательно, снижение осмолярности в дегенерированных МПД уменьшает скорость производства внеклеточного матрикса (Takeno K. et al., 2007) и инициирует воспалительные изменения (Van Dijk B. et al., 2015). Кроме того, клетки дегенерированных МПД более активно продуцируют протеазы (Roberts S. et al., 2000; Pockert A.J. et al.,

2009), которые могут разрушать вновь синтезированный имплантированными клетками внеклеточный матрикс.

При дегенерации в МПД наблюдается повышение экспрессии или постоянное присутствие провоспалительных цитокинов (Risbud M.V., Shapiro I.M., 2014). Они способствуют деградации внеклеточного матрикса, а также замедляют темпы его накопления (Seguin C.A. et al., 2005; Wang J. et al., 2011; Tian Y. et al., 2013). Более того, действия провоспалительных цитокинов могут быть сопряжены с дальнейшим увеличением нутритивной потребности клеток МПД, увеличению скорости гликолиза, приводя к дальнейшему снижению уровней глюкозы и рН и тем самым ухудшая активность и жизнеспособность как нативных, так и имплантированных клеток (Wuertz K. et al., 2009; Bendtsen M. et al., 2016).

С позиции перспектив регенерации МПД исследование экспрессии молекул, которые меняют баланс катаболизма и анаболизма внеклеточного матрикса, получили повышенный интерес. Факторы роста надсемейства ТФР- β , в частности КМБ, обладают регенераторным потенциалом. Некоторые препараты из семейства КМБ (рекомбинантный КМБ-2, рекомбинантный КМБ-7, также известный как остеогенный белок-1, Stryker Biotech, Хопкинтон, Массачусетс, США) в настоящее время одобрены для использования в хирургии позвоночника для стимулирования процессов остеогенеза при формировании спондилудеза. С недавних пор потенциальная роль КМБ активно изучается в аспекте патологии и регенерации МПД.

1.6. Потенциальное применение костных морфогенетических белков

КМБ являются частью большого надсемейства белков ТФР- β и изначально описаны как вещества, которые способны формировать экзостозы (Wozney J.M. et al., 1988). Позднее установлено, что они имеют широкий спектр хондро- и остеоиндуктивных действий во время эмбриогенеза и в дальнейшей жизни человека, а также способны регулировать разнообразные клеточные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток, продукцию

внеклеточного матрикса во многих клетках и тканях, в том числе в МПД (Такае R. et al., 1999; Булатов А.А. и соавт, 2005).

Остановимся на описании современных данных и перспективных направлениях исследований для понимания роли КМБ в восстановлении дегенерированных МПД.

Установлено, что КМБ-2 и КМБ-7 обладают способностью увеличивать синтез протеогликанов клетками МПД (Miyamoto K. et al., 2006; Kim H. et al., 2009). В исследовании L. Gilbertson и соавт. (2008) синтез протеогликанов и коллагена под воздействием КМБ-2 и КМБ -12 был увеличен в культуре клеток только ПЯ МПД человека, оказывая минимальное воздействие на клетки ФК. Показана эффективность КМБ-7 в качестве агента для восполнения элементов внеклеточного матрикса клетками ПЯ и ФК, подвергшихся ранее воздействию ИЛ-1 (Takegami K. et al., 2002).

В исследованиях *in vivo* выявлено, что КМБ-7 значительно стимулирует продукцию протеогликанов и формирование внеклеточного матрикса в МПД кролика и играет роль в поддержании и восстановлении высоты диска (An H.S. et al., 2005; Imai Y. et al., 2007). По данным K. Masuda et al. (2006), инъекции КМБ-7 в ФК дегенерированного МПД кролика влияли на увеличение высоты диска. Известно, что КМБ-2 тоже играет роль в поддержании высоты МПД: введение КМБ-2 в МПД предотвращало потерю высоты диска на ранних стадиях дегенерации на моделях животных (Larson J.W. et al, 2006).

Еще один представитель семейства ТФР- β , впервые описанный в 1994 г. – КМБ-14 – известен также как фактор роста и дифференцировки-5. КМБ-14 экспрессируется как в неповрежденном, так и в дегенерированном МПД человека, особенно в клетках ПЯ; однако в дегенерированных МПД отмечается снижение количества клеток, экспрессирующих КМБ-14 (Le Maitre C.L. et al., 2009). Показано, что КМБ-14 повышает продукцию компонентов внеклеточного матрикса МПД (протеогликанов и коллагена II типа), а также способен снижать экспрессию ММП (Cui M. et al., 2008; Feng C. et al., 2015). В исследованиях *in vitro* на клетках бычьих МПД показано, что КМБ-14 усиливает пролиферацию клеток ПЯ и ФК и

также значительно улучшает синтез протеогликанов и коллагена обоими типами клеток (Chujo T. et al., 2006). Такой же положительный эффект на синтез компонентов внеклеточного матрикса КМБ-14 получен и на культурах клеток МПД человека (Le Maitre C.L. et al., 2009). Таким образом, КМБ-14 помогает поддерживать структурную целостность МПД. В исследованиях *in vivo* выявлено, что при инъекции КМБ-14 в дегенерированные МПД мышей и кроликов восстанавливается биомеханическая устойчивость и высота диска, с улучшением результатов гистологических и МРТ исследований (Walsh A.J. et al., 2004; Chujo T. et al., 2006). Потенциальное преимущество КМБ-14 над остальными КМБ состоит в том, что он проявляет остеоиндуктивные свойства только при значительно более высоких концентрациях, следовательно, потенциально лишен негативного эффекта чрезмерной оссификации при введении в МПД.

Доставка лекарственных веществ в МПД является важной проблемой практически для всех терапевтических подходов (Blanquer S.B. et al. 2015). Эффекты большинства КМБ были изучены в экспериментах на клеточных культурах, биореакторах и при исследованиях на животных, в которых КМБ вводили в МПД с помощью инъекций, синтетических макросфер и трансфекции клеток (Gantenbein B. et al., 2015; van Dijk V.G.M. et al., 2017). Последние результаты с имплантацией модифицированных мезенхимальных стволовых клеток (внедрение гена КМБ-14 с использованием метода электропорации) в орган-культуру МПД показали, что основанная на КМБ-14 терапевтическая стратегия является перспективной для восстановления МПД (Bucher C. et al., 2013).

Клинических испытаний использования КМБ для регенерации МПД в организме человека пока не проводилось (Moriguchi Y. et al., 2016). Тем не менее, результатов доклинических исследований на культурах клеток и исследований на животных достаточно, чтобы оправдать дальнейшие работы в этом направлении. Изучение влияния КМБ на биосинтетическую активность клеток ПЯ и ФК является актуальным для оценки потенциальных патофизиологических механизмов регенерации МПД. Для дальнейшей трансляции этого подхода необходима оценка безопасности инвазивной внутридискковой доставки, определение оптимальной

дозы, продолжительности и частоты воздействия, что потребует значительного времени, прежде чем будет возможна его практическая реализация в клинике.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Неврологического института Барроу (г. Феникс, США) и одобрена этическими комитетами ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол заседания от 27.11.2015), ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (протокол № 10 от 31.08.2015) и Неврологического института Барроу. Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-30037) и стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (СП-2545.2018.4).

2.1. Характеристика исследованного клинического и аутопсийного материала

Получение клинического операционного материала МПД осуществляли у выразивших добровольное согласие пациентов-участников исследования при проведении плановых операций дискэктомии на пояснично-крестцовом отделе позвоночника в нейрохирургическом отделении НУЗ «Дорожной клинической больницы на ст. «Иркутск-Пассажирский» ОАО «РЖД», являющейся клинической базой кафедры нейрохирургии и инновационной медицины ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России. Исследован операционный материал МПД от 30 пациентов в возрасте от 26 до 57 лет. Показанием к операции стал выраженный болевой синдром в поясничной области при дегенеративных процессах в МПД и отсутствие эффекта от консервативной терапии в течение более 4 недель. Критериями исключения к выбору доноров явились перенесенные ранее оперативные вмешательства на пояснично-крестцовом отделе позвоночника, применение химиотерапевтических препаратов, проведение радиотерапии в области позвоночника, наличие системных заболеваний соединительной ткани, сколиоза, сахарного диабета.

Изучен аутопсийный материал МПД пояснично-крестцового отдела позвоночника в количестве 14 образцов. Выделяли позвоночно-двигательные сегменты на уровне верхнего края тела позвонка L_{II} и до нижнего края L_{IV} и в одном случае – L_V (Рисунок 3). Аутопсийный материал МПД забирали на базе ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы». Возраст умерших варьировал от 25 до 64 лет (средний возраст – $44,7 \pm 12,1$ г). Среднее значение времени, прошедшего от момента наступления смерти, составило $20,3 \pm 9,9$ ч. Причинами смерти умерших явились болезни, не связанные с дегенеративными заболеваниями позвоночника: ишемическая болезнь сердца, заболевания желудочно-кишечного тракта, алкогольная кардиомиопатия, отравление этиловым алкоголем, механическая асфиксия. Извлеченные блок-препараты транспортировали в лабораторию в термоконтейнере при температуре 4°C .

2.2. Исследование диффузионного транспорта и микроструктуры межпозвонкового диска

Сразу после транспортировки в лабораторию аутопсийные блок-препараты помещали в пластиковый контейнер и заливали агар-агаром в строго вертикальном положении с последующим исследованием на аппарате МРТ с напряженностью магнитного поля 1,5 Тл (Siemens Magnetom Essenza, Германия) с использованием катушки для тела с получением T1-взвешенных изображений, T2-взвешенных изображений, ДВ изображений (Бывальцев и соавт., 2016). Методика ДВ МРТ оценивает состояние МПД путем мониторинга движения свободных молекул воды и растворенных в ней веществ. Для оценки степени дегенерации МПД по данным T2-взвешенных МР-изображений использована классификация по Pfirrmann (Pfirrmann C.W. et al., 2001). Серию ДВ изображений получали при значениях b 50, 400 и 800 с/мм², изображения получены с диффузионными градиентами в 3х ортогональных направлениях – $[0\ 0\ 1]$ $[0\ 1\ 0]$ и $[1\ 0\ 0]$. Общее время сканирования для каждого пациента составило 6 мин 30 с. Диффузионный транспорт в МПД оценивали посредством построения и количественной оценки карт коэффициента диффузии (КД) в программе OsiriX Lite (Pixmeo, Швейцария).

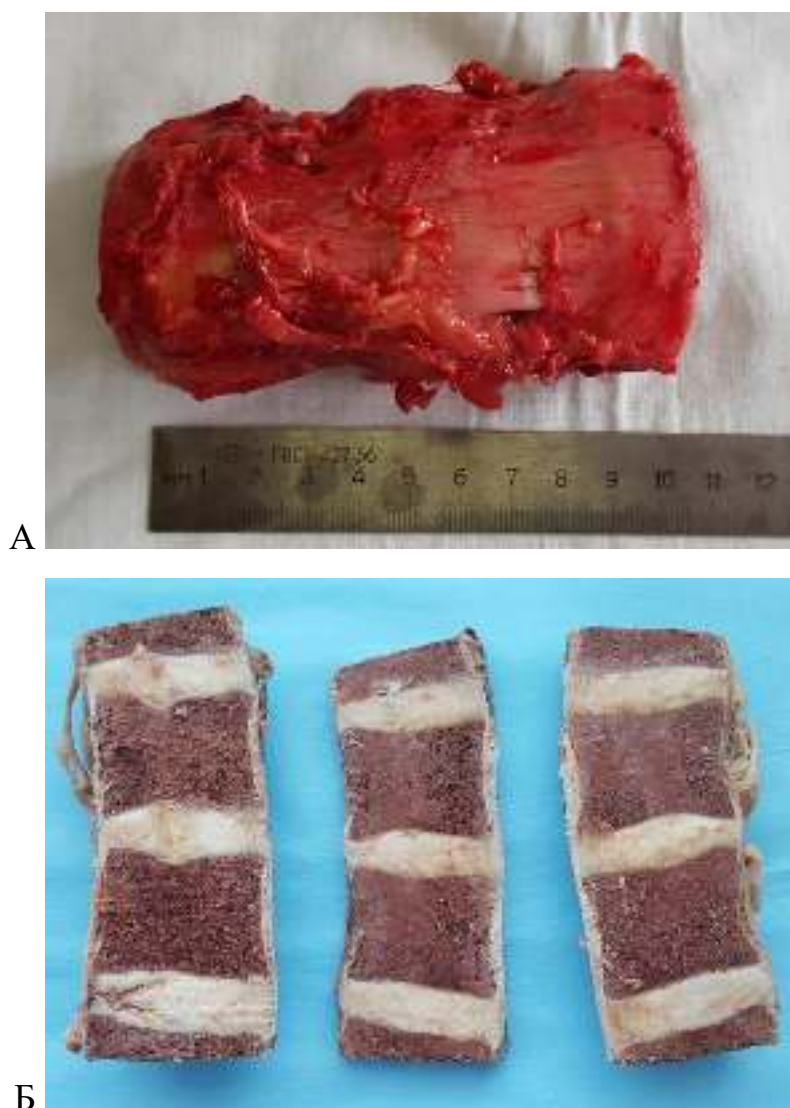


Рисунок 3 – Аутопсийный блок-препарат пояснично-крестцового отдела позвоночника на этапе подготовки к МРТ (А) и морфологическому исследованию после фиксации и декальцинации (Б)

Для морфометрического анализа выделяли под 8-кратным увеличением бинокулярной лупы Eye Mag ProS (Carl Zeiss, Германия) фрагменты ткани МПД размером $0,5 \text{ см}^3$ в срединной сагиттальной плоскости с сохранением целостности замыкательных пластинок: передний отдел ФК, область ПЯ и задний отдел ФК. Операционный и аутопсийный материал фиксировали в забуференном растворе 10 % нейтрального формалина и декальцинировали в растворе муравьиной кислоты. Проводка осуществлялась в автоматическом процессоре VIP-E150F (Sacura, Япония), заливка – в автоматической системе заливки материала в парафин

ТЕС-IV (Sacura, Япония). Резка стандартных серийных срезов толщиной 5 мкм проводилась на микротоме CM-502 (Microm, Германия) с использованием одноразовых ножей. Все срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия). Гистологические препараты сканировали на микроскопе (Axio Vert.A и Axiosam 506 color, Carl Zeiss, Германия), количественную оценку проводили в программе "Fiji" (НИН, США) (Schindelin J. et al., 2012) с использованием модуля "Automatic Cell Counting", плотность клеток выражали в числе клеток/мм³ (Tomaszewski K.A. et al., 2015).

Иммуногистохимический анализ и электронную микроскопию проводили в центре коллективного пользования "Электронная микроскопия" Объединенного центра ультрамикрoанализа Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск) в соответствии с договором в рамках гранта РФФИ 15-15-30037 (к.м.н. Судаков Н.П., к.м.н. Клименков И.В.). Для иммуногистохимического анализа фрагменты ткани операционного и аутопсийного материала фиксировали 4% параформальдегидом (Sigma, США) при 4 °С в течение 24 ч. Забирались образцы объемом около 4 мм³; на один клинический случай формировали 5 микропрепаратов. Далее образцы в течение 1 ч инкубировали в блокирующем буфере – растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) с 0,25 % раствором тритона X-100 (Amresco, США) и 1 % растворе альбумина (Amresco, США). Затем инкубировали с первичными антителами при 4 °С в течение 14 ч. Основные компоненты внеклеточного матрикса МПД определяли с помощью панели первичных IgG антител (Abcam, США): мышинные антитела к коллагену I (ab90395; 1:200), кроличьи – к коллагену II (ab34712; 1:200), мышинные – к коллагену X (ab49945; 1:200), кроличьи – к коллагену XI α2 (ab196613; 1:200) и кроличьи – к агрекану (ab186414; 1:200), которые окрашивали вторичными IgG антителами, меченными Alexa Fluor 594 (Abcam, США), к кроличьим (ab150080) или мышинным (ab150116) антителам (Abcam, США). Ядра окрашивали Hoechst 33342 (ThermoFisher, США), период инкубации составлял 20 мин (Life Sciences, США). Препараты, заключенные в ProLong gold (Life Sciences, США), сканировали на лазерном конфокальном микроскопе LSM-710 (Carl Zeiss, Германия). Полученные Z-стеки (условные срезы)

анализировали с помощью программ Imaris 7.2.3 (Bitplane AG, Швейцария) и ZEN (Carl Zeiss, Германия), позволяющих реконструировать полученные изображения МПД в 3D формате с количественной оценкой анализируемых структур межклеточного матрикса. Используя программное обеспечение, рассчитывали области, занимаемые объемом флуоресцентного сигнала для каждого типа исследуемых компонентов межклеточного матрикса в 1×10^6 мкм³ ткани.

Для просвечивающей электронной микроскопии фрагменты МПД фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере в течение 3 ч с последующей постфиксацией в 2 % OsO₄ на том же буфере в течение 12 ч. После дегидратации образцы заливали в эпоксидную смолу, осуществляли нарезку на ультрамикротоме Ultracut R (Leica, Германия) и исследовали на электронном микроскопе Leo 906 E (Carl Zeiss, Германия).

2.3. Методы работы с культурами клеток

2.3.1. Получение и культивирование клеток межпозвонкового диска

Работа на клеточных культурах МПД проводилась на базе лаборатории нейрохирургии Неврологического института Барроу. В качестве клеток неповрежденного МПД использовали клеточные культуры, полученные из ФК и ПЯ здорового донора женского пола без вертеброгенной патологии (Sciencell Research Laboratories, Карлсбад, Калифорния, США). Клетки размораживали на водяной бане при 37 °С и культивировали в монослое в стерильных флаконах с площадью поверхности 25 см² в питательной среде, состоящей из 89 % Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 (DMEM/F-12) (ThermoFisher, США), дополненной 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Life Technologies, США) и 1 % раствором пенициллина и стрептомицина (Sigma, США) при температуре 37 °С, 95 % влажности и 5 % CO₂.

Клетки дегенерированного МПД получили путем выделения их из биоптатов тканей ПЯ и ФК дегенерированного МПД человека при проведении плановой операции дискэктомии на поясничном отделе позвоночника по поводу

дегенеративно-дистрофического заболевания МПД. Донор – женщина 48 лет, индекс массы тела 28.4, дегенеративные изменения МПД на уровне L_{IV}-L_V III степени по Pfirrmann (Pfirrmann C.W. et al., 2001). Фрагменты МПД сразу после экстракции помещались в питательную среду, состоящую из 89 % DMEM/F-12, 10 % ЭТС и 1 % раствора пенициллина и стрептомицина, и доставлялись в лабораторию. Ткани ПЯ и ФК тщательно отделяли друг от друга, отмывали в однократном натрий-фосфатном буферном растворе с 5 % содержанием пенициллина и стрептомицина. Клетки выделяли методом ферментативной дезагрегации (Ким И.И., 2006; Chan L.K. et al., 2013; Hwang M.H. et al., 2015): в стерильных условиях в ламинарном боксе ткани механически измельчали до кусочков размерами 1-3 мм², инкубировали в 0,24 % растворе проназы (Sigma, США) в течение 1 часа и затем в 0,05 % растворе коллагеназы II типа (Sigma, США) в течение 6 часов в термостате при температуре 37 °С. Раствор коллагеназы со взвесью клеток пропускали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 70 мкм (Fisher, США), затем клетки дважды отмывали питательной средой и центрифугировали при 150 g в течение 10 мин. Клеточный осадок затем переносили в культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см² и питательной средой DMEM/F-12, дополненной 10 % ЭТС и 1 % раствором пенициллина и стрептомицина и культивировали при температуре 37 °С, 95% влажности, 5 % содержанием CO₂ (Рисунок 4). Замену среды осуществляли через каждые два дня. При заполнении клеточным слоем 90 % поверхности флакона, что занимало приблизительно 5 дней, клетки отделяли с помощью 0,25 % раствора трипсина (GE Healthcare Life Sciences, США) по стандартной методике и пересевали в соответствии с дальнейшим экспериментом.

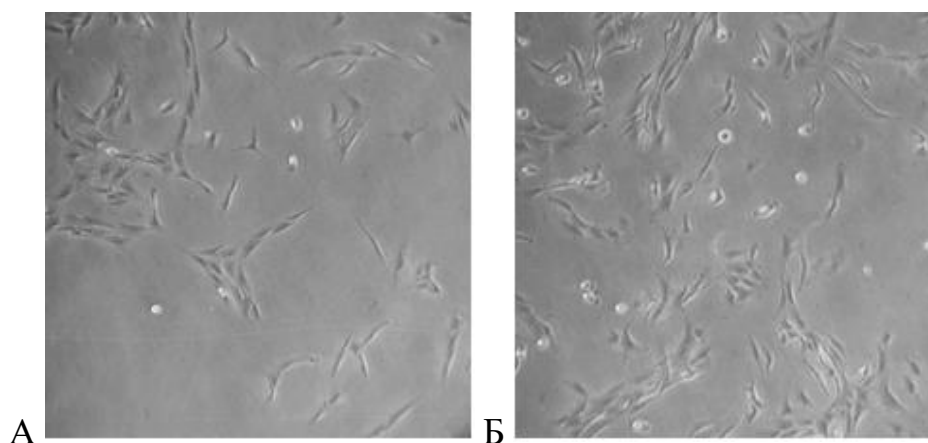


Рисунок 4 – Микрофотографии монослойных культур клеток ПЯ (А) и ФК (Б), выделенных из дегенерированных МПД человека. Отмечается схожая форма клеток ПЯ и ФК в виде веретенообразных фибробластоподобных клеток. Фазово-контрастная микроскопия с зеленым фильтром, увеличение 240х

2.3.2. Культивирование клеток линии ТНР-1

Исследования проводили с использованием моноцитоподобных клеток линии ТНР-1. Клеточная линия ТНР-1 была получена из периферической крови годовалого ребенка с острой моноцитарной лейкемией (АТСС Т1В-202, АТСС, США). Данная клеточная линия широко используется для исследования иммунных реакций благодаря их способности к дифференцировке в присутствии форболмиристатацетата в макрофагоподобные клетки (Oquendo J. et al., 1996, Chanput W. et al., 2014), которые секретируют провоспалительные цитокины. Таким образом, клетки линии ТНР-1 способны секретировать ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-8 и ряд других цитокинов (Kim J.H. et al., 2008; Онохина Я.С. и др., 2013; Bosshart H., Heinzelmann N., 2016).

Клетки размораживали на водяной бане при 37 °С, переносили в культуральные флаконы для суспензионных культур с площадью поверхности 75 см² и культивировали в среде Roswell Park Memorial Institute, известной как RPMI-1640 (АТСС, США) с добавлением 10% ЭТС (Life Technologies, США) и 1% раствором пенициллина и стрептомицина (Sigma, США) при температуре 37 °С, 95 % влажности, 5 % CO₂. Клеточная линия ТНР-1, являясь суспензионной

культурой, пересевалась каждые 2 дня. Необходимое количество клеток забирали в эксперимент, а оставшуюся часть клеток для следующего опыта продолжали культивировать в прежних условиях, добавляя свежую питательную среду.

2.4. Дизайн эксперимента

2.4.1. Исследование влияния провоспалительных цитокинов на клетки межпозвонкового диска

Инкапсуляция клеток МПД в альгинатные микросферы. Исследование влияния провоспалительных цитокинов проводили в условиях трехмерного культивирования клеток МПД в альгинатных микросферах. Известно, что клетки МПД, культивируемые в монослое, со временем изменяют свои морфологию и фенотип, становясь похожими на фибробласты (Wang J. et al., 2001). Однако культивирование клеток МПД в трехмерных культурах, таких как альгинатные системы, позволяют восстанавливать изначальные фенотип и морфологию клеток МПД, сходных с таковыми *in vivo* (Chou A.I. et al., 2008).

Для приготовления 1,2 % раствора альгината натрия в стеклянный стакан вносилась навеска 1,2 г. альгината натрия и 100 мл среды DMEM/F-12. Навеска растворялась при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1 часа, затем раствор стерилизовали автоклавированием при температуре 121 °С в течение 20 мин. Перед инкапсуляцией культивированные в монослое клетки ПЯ и ФК снимали с субстрата с помощью 0,25 % раствора трипсина, осаждали путем центрифугирования при 150 g в течение 5 мин, затем промывали 0,9 % раствором хлорида натрия и ресуспендировали в 1,2 % растворе альгината натрия. Суспензию с концентрацией 10^6 клеток/мл переносили в стерильный шприц объемом 1 мл и с помощью иглы для инъекций диаметром 21G распыляли в раствор, содержащий 102 мМ хлорида кальция. Полученные микросферы имели диаметр 2 мм и объем 10 мкл.

Для полимеризации альгинатные микросферы с клетками выдерживали в 102 мМ растворе хлорида кальция 10 мин, а затем проводили ступенчатую отмывку

от избытка ионов кальция 0,9 % раствором хлорида натрия. Микросферы с клетками культивировали в лунках 12-луночного планшета в среде DMEM/F-12, дополненной 10 % ЭТС и 1 % раствором пенициллина и стрептомицина (Рисунок 5) в течение 7 суток до начала эксперимента; данный промежуток времени позволяет восстановить изначальную морфологию клеток МПД (Lemare F. et al., 1998; Walter B.A. et al., 2015).



Рисунок 5 – Общий вид альгинатных микросфер с инкапсулированными клетками МПД в лунках 12-луночного планшета, средний диаметр микросфер – 2 мм

Активация клеток ТНР-1. Накануне опыта для стимуляции клеточной дифференцировки клетки линии ТНР-1 в количестве 2×10^5 вносили в лунки 12-луночного плоскодонного планшета и культивировали в 2 мл среды RPMI-1640 в присутствии 100 нМ форбол-12-миристан-13-ацетата (Sigma, США) в течение 72 часов (Park J.J. et al., 2016; Richter E. et al., 2016). Дифференцированные (активированные) макрофагоподобные клетки линии ТНР-1 адгезировались к поверхности культуральной лунки. Контроль однородности монослоя проводили методом фазово-контрастной микроскопии с использованием инвертированного микроскопа с зеленым светофильтром (Axio, Carl Zeiss, Германия). Активированные ТНР-1 клетки утрачивают способность к пролиферации (Schwende H. et al., 1996).

Сокультивирование клеток. В литературе описаны *in vitro* модели,

реализующие воздействие провоспалительных цитокинов на клетки МПД: добавление отдельных или нескольких провоспалительных цитокинов (Wang J. et al., 2013; Walter B.A. et al., 2015), модели сокультивирования клеток МПД с аутологичными или аллогенными мононуклеарами периферической крови (Liu Z.H. et al., 2013; Stich S. et al, 2015), а также с моноцитоподобными клетками линии ТНР-1 (Kim J.H. et al., 2008; Park J.J. et al., 2016), что является наиболее физиологичным в аспекте воспроизводства комплексного цитокинового влияния.

Совместное культивирование клеток МПД и активированных ТНР-1 клеток проводили с использованием 12 мм трансвеллов с размером пор 0,4 мкм (Transwell, Corning, США), установленных в лунки плоскодонного планшета. В лунку с активированными клетками ТНР-1 помещали трансвелл и вносили альгинатные микросферы с клетками ПЯ или ФК в концентрации $2 \cdot 10^5$ /мл. Таким образом, соотношение количества клеток ПЯ или ФК и ТНР-1 в каждой лунке составляло 1:1. Трансвеллы предотвращают фагоцитоз, в то же время допуская паракринные взаимодействия через поры путем свободной циркуляции жидкости.

Исследование проводили в группах неповрежденных и дегенерированных клеток ПЯ и ФК в сокультивировании с активированными клетками ТНР-1. В качестве контроля использовали соответствующие монокультуры клеток МПД, а также культуру активированных ТНР-1 (Рисунок 6).

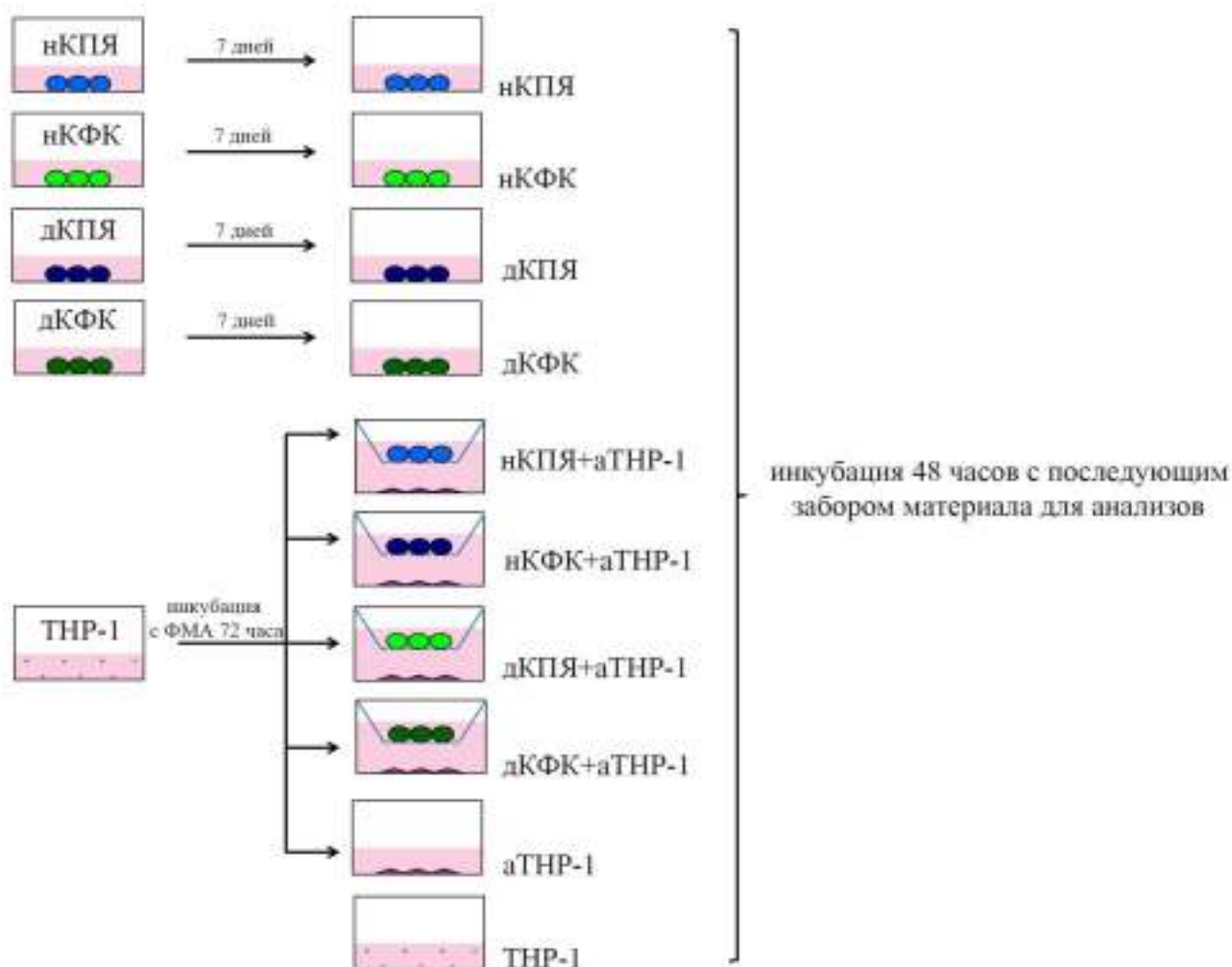


Рисунок 6 – Схема эксперимента по совместному культивированию клеток МПД и ТНР-1 клеток. Обозначения: нКПЯ – неповрежденные клетки пульпозного ядра; нКФК – неповрежденные клетки фиброзного кольца; дКПЯ – дегенерированные клетки пульпозного ядра; дКФК – дегенерированные клетки фиброзного кольца; ТНР-1 – моноцитоподобные клетки линии ТНР-1; ФМА – фобол-12-миристан-13-ацетат; аТНР-1 – активированные ФМА макрофагоподобные клетки линии ТНР-1

Клетки инкубировали в среде DMEM/F-12 (ThermoFisher, США), дополненной 10 % ЭТС и 1 % раствором пенициллина и стрептомицина в течение 48 ч. при 37 °С во влажной атмосфере и 5 % CO₂. После инкубации надосадочную жидкость и клетки МПД собирали и проводили анализ уровня секреции цитокинов, оценку нутритивного статуса, метаболизма и синтетической активности клеток.

Общая временная схема эксперимента представлена на Рисунке 7.

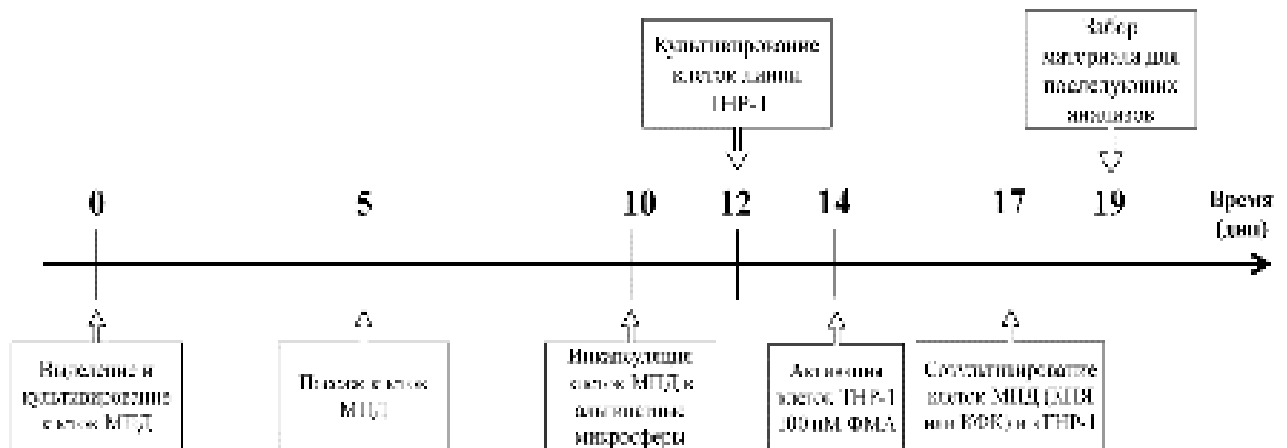


Рисунок 7 – Шкала времени эксперимента по исследованию влияния провоспалительных цитокинов на клетки МПД

2.4.2. Исследование влияния костных морфогенетических белков на клетки межпозвонкового диска

После первого пассажа и пересева в соотношении 1:4, клетки ПЯ и ФК от неповрежденного и дегенерированного МПД разделены на 4 группы каждая: 1) клетки, выращиваемые в среде без добавления КМБ (контрольная среда), 2) клетки, выращиваемые в среде с добавлением КМБ-2 в концентрации 100 нг/мл (Bone Morphogenetic Proteins Human Recombinant, ProSpec, США), 3) клетки, выращиваемые в среде с добавлением КМБ-7 100 нг/мл (Bone Morphogenetic Proteins Human Recombinant, ProSpec, США), 4) клетки, выращиваемые в среде с добавлением КМБ-14 100 нг/мл (Bone Morphogenetic Proteins Human Recombinant, ProSpec, США). Смену питательных сред проводили каждые два дня. Забор материала для анализа производили на 5-ый день культивирования. Выбор продолжительности культивирования и концентраций КМБ основывался на данных литературы (Gilbertson L. et al., 2008; Kim S.H. et al., 2015).

2.5. Методы исследования культур клеток межпозвонкового диска

Мультиплексный анализ уровня секреции цитокинов при совместном культивировании клеток линии ТНР-1 и клеток МПД человека

Через 48 часов совместного культивирования клеток МПД с активированными ТНР-1 клетками кондиционированные среды собирали и хранили при температуре минус 80 °С до тестирования. Затем после разморозки образцов проводили мультиплексный анализ содержания ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-12p70 методом проточной цитометрии с использованием микросфер (Cytometric Bead Array, BD, США) на цитофлуориметре FACSAria II (BD, США), используя стандартный набор производства фирмы BD (США).

Оценка пролиферативной активности клеток МПД при воздействии костных морфогенетических протеинов

С целью анализа пролиферативной активности клеток МПД при воздействии костных морфогенетических протеинов клеточные культуры ПЯ и ФК культивировали в соответствии с группами эксперимента в чашках Петри диаметром 35 мм с и покровным стеклом в дне толщиной 1,5 мм и диаметром 10 мм. (MatТес, США), покрытого поли-D-лизином. Смену питательных сред проводили каждые два дня, продолжительность культивирования для всех групп составила 4 суток. Культивирование клеток в средах с добавлением КМБ-2, -7, 14, а также в среде без добавления КМБ (контрольной среде) проводили в течение 4 суток.

Проводилась ежедневная оценка состояния клеточных культур методом фазово-контрастной микроскопии с помощью инвертированного микроскопа с зеленым светофильтром (Axio Vert.A1, Carl Zeiss, Германия). Цифровые изображения для дальнейшей обработки получали путем фотографирования камерой Canon на увеличении 200x (окуляр 10x, объектив 20x) 6 полей зрения каждой культуральной чашки. Фотографирование проводили ежедневно в течение 4 дней в одно и то же время. Полученные файлы сохраняли в формате *JPG. Анализ

цифровых изображений проводили в программе Fiji (NIH, США) с использованием плагина для подсчета клеток (Schindelin J. et al., 2012).

Полученные данные анализировали с помощью математической модели, описывающей рост клеток:

$$P = P_0 e^{rt} \quad (1),$$

где P – это нормализованная популяция;

P_0 – изначально нормализованная популяция;

r – коэффициент скорости роста;

t – время.

В данном исследовании P_0 принимали равным 1 для нормализации данных.

Исследование нутритивного статуса и метаболизма клеток МПД

Подсчет количества клеток. Подсчет количества клеток и оценку их жизнеспособности в культуре производили с использованием теста с трипановым синим 0,4 % (ThermoFisher Scientific, США), основанного на способности красителя проникать сквозь поврежденные клеточные мембраны; живые клетки при этом не окрашиваются (Louis K.S., 2011). Подсчет числа окрашенных и неокрашенных клеток проводился с помощью автоматического счетчика клеток (Countess II Automated Cell Counter, ThermoFisher Scientific, США). Подсчет клеток с использованием теста с трипановым синим показал высокий процент живых клеток во всех исследуемых группах с общим средним показателем $94,4 \pm 4,2$ % для монослойных культур и $93 \pm 3,2$ % для трехмерных культур. Числовые значения подсчета клеток использовались для расчета скорости потребления глюкозы и продукции лактата, метаболической активности и продукции ГАГ клетками МПД.

Исследование потребления глюкозы. Содержание глюкозы в клеточной среде определяли энзиматическим методом Далквиста (Меньшиков В.В., 1987). Образцы культуральной среды депротеинизировали с применением спиновых фильтров с границей пропускания 10 кДа путем центрифугирования при 13000 g в течение 10 мин. Образцы разбавляли 1:100 и помещали в лунки 96-луночного полистиролового плоскодонного планшета с добавлением реакционной смеси,

состоящей из 12,5 Ед/мл глюкозооксидазы, 2,5 Ед/мл пероксидазы хрена, 0,4 мМ орто-дианизидина и 500 мМ фосфатного буфера и доведенной до уровня рН 7.0 (все реагенты Sigma, США). Реакция протекала в течение 30 мин при температуре 37 °С. Для стабилизации окраски полученного раствора добавляли 12 н. раствора серной кислоты, которая взаимодействовала с окисленным орто-дианизидином. Концентрация окисленной формы данного хромогена прямо пропорциональна концентрации глюкозы в исследуемом материале и определялась спектрофотометрически при длине волны 540 нм (спектрофотофлуориметр Tecan Infinite 200Pro, Tecan, Швейцария). Калибровочную кривую для расчетов получили с помощью стандартного раствора D-глюкозы известных концентраций 0-111 мкмоль/л. Стандартную пробу ставили параллельно с опытной и обрабатывали ее в тех же условиях. Полученные значения использовали для расчета скорости потребления глюкозы, используя следующие соотношения:

$$R_G = \frac{[G_0] - [G]}{[P] \times t} \quad (2),$$

где R_G – скорость потребления глюкозы, нмоль/(кл*ч);

$[G]$ – концентрация глюкозы, полученная с помощью анализа, нмоль/мл;

$[G_0]$ – исходная концентрация глюкозы в среде, нмоль/мл;

$[P]$ – число клеток/мл; значения взяты из подсчета количества клеток с трипановым синим;

t – период времени нахождения клеток в среде, ч.

Исследование продукции лактата. Для определения количества молочной кислоты в исследуемом материале применяли ферментативный метод Хохорста с модификациями (Резяпкин В.И. и др., 2009). После процедуры депротеинизации и разбавления образцов 1:100, образцы культуральной среды в объеме 100 мкл помещали в лунки 96-луночного планшета и добавляли реакционную смесь, состоящую из гидразин-глицинового буфера, 6 мМ раствора НАД⁺. рН реакционной смеси доводили до 9.5 2 н. раствором NaOH (все реагенты Sigma, США). В последнюю очередь добавляли в лунки 2 кл 550 Ед/мл раствора L-лактатдегидрогеназы и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 340 нм. Стандартную кривую для расчетов получили с помощью известных концентраций лактата 20-100 мкМ. Полученные значения использовали для расчета скорости продукции лактата, используя следующую формулу:

$$R_L = \frac{[L]-[L_0]}{[P] \times t} \quad (3),$$

где R_L – это скорость производства лактата, нмоль/(кл*ч);

$[L]$ – концентрация лактата, полученная с помощью анализа, нмоль/мл;

$[L_0]$ – исходная концентрация лактата в питательной среде до начала культивирования, нмоль/мл;

$[P]$ – число клеток/мл;

t – период времени нахождения клеток в среде, ч.

Для расчета скорости продукции лактата клетками МПД в группах сокультивирования с клеточной линией ТНР-1 формулу модернизировали следующим образом:

$$R_L = \frac{[L]-[L_0]-[L_{ТНР-1}]}{[P] \times t} \quad (4),$$

где R_L – это скорость производства лактата,

$[L]$ – концентрация лактата, полученная с помощью анализа, нмоль/мл;

$[L_0]$ – исходная концентрация лактата в питательной среде до начала культивирования, нмоль/мл;

$[L_{ТНР-1}]$ – концентрация лактата, выделенная клетками ТНР-1, нмоль/мл;

$[P]$ – число клеток/мл;

t – период времени нахождения клеток в среде, ч.

Оценка метаболической активности клеток. Для оценки активности метаболических процессов в клетках применяли тест-систему с индикатором Alamar blue (Alamar Blue reagent, Invitrogen, США). Редокс-индикатор Alamar blue, проникая через биологические мембраны клеток, восстанавливается пропорционально активности внутриклеточных окислительно-восстановительных ферментов, преобразуясь из «синей» формы с максимальным поглощением при

600 нм в «красную» форму с максимальным поглощением при 570 нм, что путем измерения абсорбции или флюоресценции позволяет определять восстановленную форму Alamar blue.

Редокс-индикатор Alamar blue добавляли в среду с клетками в соотношении 1:10, инкубировали в течение 2 часов при температуре 37 °С. После этого среду с индикатором помещали в лунки 96-луночных планшетов и проводили измерение оптической плотности восстановленной формы индикатора в среде на планшетном спектрофлуориметре (Tecan Infinite 200Pro, Tecan, Switzerland) при длине волны в диапазоне 570-600 нм. Показатели теста нормализовали с учетом количества клеток в культуре.

Исследование синтетической активности клеток МПД

Оценка продукции протеогликанов. Количество сульфатированных ГАГ, наиболее часто встречающихся в составе протеогликанов МПД, определяли с использованием тест-системы, основанной на реакции с 1,9-диметил-метиленовым голубым, с модификациями (Coulson-Thomas V., Gesteira T.F., 2014; Zheng C., Levenston M.E., 2015).

Для деполимеризации альгината натрия микросферы помещали в раствор, содержащий 50 мМ цитрата натрия, 30 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и 150 мМ хлорида натрия, на 10 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 500 g в течение 3 мин. Клетки из монослойных культур осаждали путем центрифугирования при скорости вращения ротора 200 g в течение 4 мин. Далее протокол был одинаков для всех типов культур: клеточный осадок ресуспендировали в однократном натрий-фосфатном буферном растворе с последующей глубокой заморозкой при минус 80 °С. Перед проведением исследования образцы размораживали на водяной бане и центрифугировали. Клетки из каждого флакона ресуспендировали в 1 мл 50 мкг/мл раствора протеиназы К; рН раствора доведен до 8,0 с использованием 1 н. HCl. Полученный раствор с целью лизиса клеток инкубировали при температуре 56 °С в течение 12 часов, а затем для инактивации протеиназы К – при температуре 90 °С в течение

10 мин. Образцы пипетировали в 96-луночные планшеты и в каждую лунку добавляли заранее приготовленный раствор 1,9-диметил-метиленового голубого с рН 3,0. После этого незамедлительно производили измерение абсорбции на планшетном спектрофотометре (Tecan Infinite 200Pro, Tecan, Switzerland) при длине волны 525 нм. Стандартную кривую для расчетов получили с использованием бычьего хондроитин-4-сульфата известных концентраций в значениях 0-1 нг/мл.

Иммуноцитохимическое исследование клеток МПД

Для оценки морфологии и расположения клеток внутри трехмерных культур альгинатные микросферы фиксировали 4 % раствором параформальдегида в однократном натрий-фосфатном буферном растворе с добавлением 100 мМ раствора CaCl₂, пермеабилizировали 0,2 % раствором Triton X-100 и промывали 0,1 % раствором Twin-20.

В свою очередь, после 4 суток монослойного культивирования в средах, обогащенных КМБ-2, -7 или -14, клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида в однократном натрий-фосфатном буферном растворе, пермеабилizировали 0,2 % раствором Triton X-100 и промывали 0,1 % раствором Twin-20.

Дальнейшие этапы протокола были одинаковыми для всех видов культур клеток. Окраску на F-актиновые микрофиламенты цитоскелета проводили с помощью красителя Alexa Fluor® 633 phalloidin (Life Technologies, США) согласно рекомендациям производителя в разведении 1:400. Окраску ядерной ДНК клеток производили 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (NucBlue® Fixed Cell ReadyProbes®, Life Technologies, США) согласно рекомендациям производителя в разведении 1:20. Окрашенные препараты монослойных и трехмерных культур исследовали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (Zeiss LSM 710, Carl Zeiss, Германия, объективы C-Apochromat 20x/0,8, C-Apochromat 63x/1.20 W M27) при конфокальной апертуре 1 единица Аири. Для возбуждения флюорофоров использовали лазеры длиной волны 405 нм и 633 нм соответственно

с регистрацией флуоресцентного сигнала в диапазоне 410-585 нм и 638-747 нм для DAPI и Alexa Fluor 633 соответственно. Мощность лазера и чувствительность детектора оптимизировали до заполнения динамической шкалы фотомножительной трубки. Размер пикселя и количество плоскостей сканирования по Z-оси устанавливали в соответствии с теоремой Найквиста. Изображения получали при 12 и 8 бит без нелинейного процессинга. Волюметрические изображения трехмерных культур клеток МПД реконструировали в модуле определения клеток, программах Imaris (Bitplane), Zen (Zeiss) и Fiji (Schindelin J. et al., 2012) с последующим анализом объемов клеток (V_{cell}), цитоплазмы (V_c), ядра (V_n), ядерно-цитоплазматического отношения ($R_{n/c}$), коэффициента сферичности ядра (K_s) (Swanson J.A. et al., 1991). Так же определяли морфологические особенности, включая кластерное расположение, пальцеобразные выпячивания и компартментализацию (Hunter C.J. et al., 2003; Johnson W.E., Roberts S., 2003).

2.6. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных данных произведена в программе Microsoft Excel и Statistica 9.0. Количественные данные представлены в виде среднего (M) и стандартного отклонения (SD) в виде $M \pm SD$ или в виде медианы и интерквартильного размаха в виде Me (25 %; 75 %). Использованы критерии t Стьюдента, χ^2 для количественных и бинаминальных типов переменных соответственно. Для множественного сравнения в независимых группах использовали критерии ANOVA, для попарного сравнения независимых групп использовали критерии непараметрической статистики Mann-Whitney U-test. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Анализ силы корреляции проводили с помощью коэффициента корреляции Пирсона (R^2).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Комплексный анализ диффузионного транспорта и микроструктуры межпозвонкового диска

Блок-препараты пояснично-крестцового отдела позвоночника получали в среднем в течение $20,3 \pm 9,9$ ч после наступления смерти. Последующие морфологическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследования показали отсутствие значимых неспецифических посмертных изменений в МПД. По данным T2-взвешенных МР-изображений, 1 МПД имел I степень дегенерации по Pfirrmann, 7 МПД – II степень, 5 МПД – III степень. Нами проведен корреляционный анализ степени дегенерации МПД по Pfirrmann и КД различных отделов МПД по ДВ изображений МРТ. Степень дегенерации исследованных МПД по Pfirrmann на основе оценки T2-изображений имела значимую корреляцию с КД ПЯ ($r = -0,69, p < 0,05$). Уровень исследованных поясничных МПД, в отличие от степени дегенерации, не имел корреляции со значениями КД ($r = 0,17, p = 0,2$; $r = -0,23, p = 0,15$; $r = -0,27, p = 0,08$ для МПД L_{II}-L_{III}, L_{III}-L_{IV} и L_{IV}-L_V соответственно).

Корреляционный анализ клеточной плотности и КД в различных отделах МПД (Рисунок 8, Таблица 2), выявил значимую обратную ранговую корреляцию ($r = -0,49, p < 0,05$). Значительная доля в данной связи принадлежит ПЯ, обладающему низкой клеточной плотностью при наиболее высоком показателе КД. При оценке задних отделов МПД наблюдалась прямая корреляция между значением КД и клеточной плотностью в области задних отделов ФК ($r = 0,84, p < 0,05$), а также в замыкательной пластинке на уровне задних отделов ФК ($r = 0,86, p < 0,05$). В целом сравнительный анализ показал, что исследованные отделы МПД обладают различными показателями клеточной плотности и диффузионного транспорта. Наблюдающаяся корреляция умеренной силы позволяет заключить, что клеточная плотность отражает различный по степени вклад в измеряемый КД в зависимости от отделов МПД.

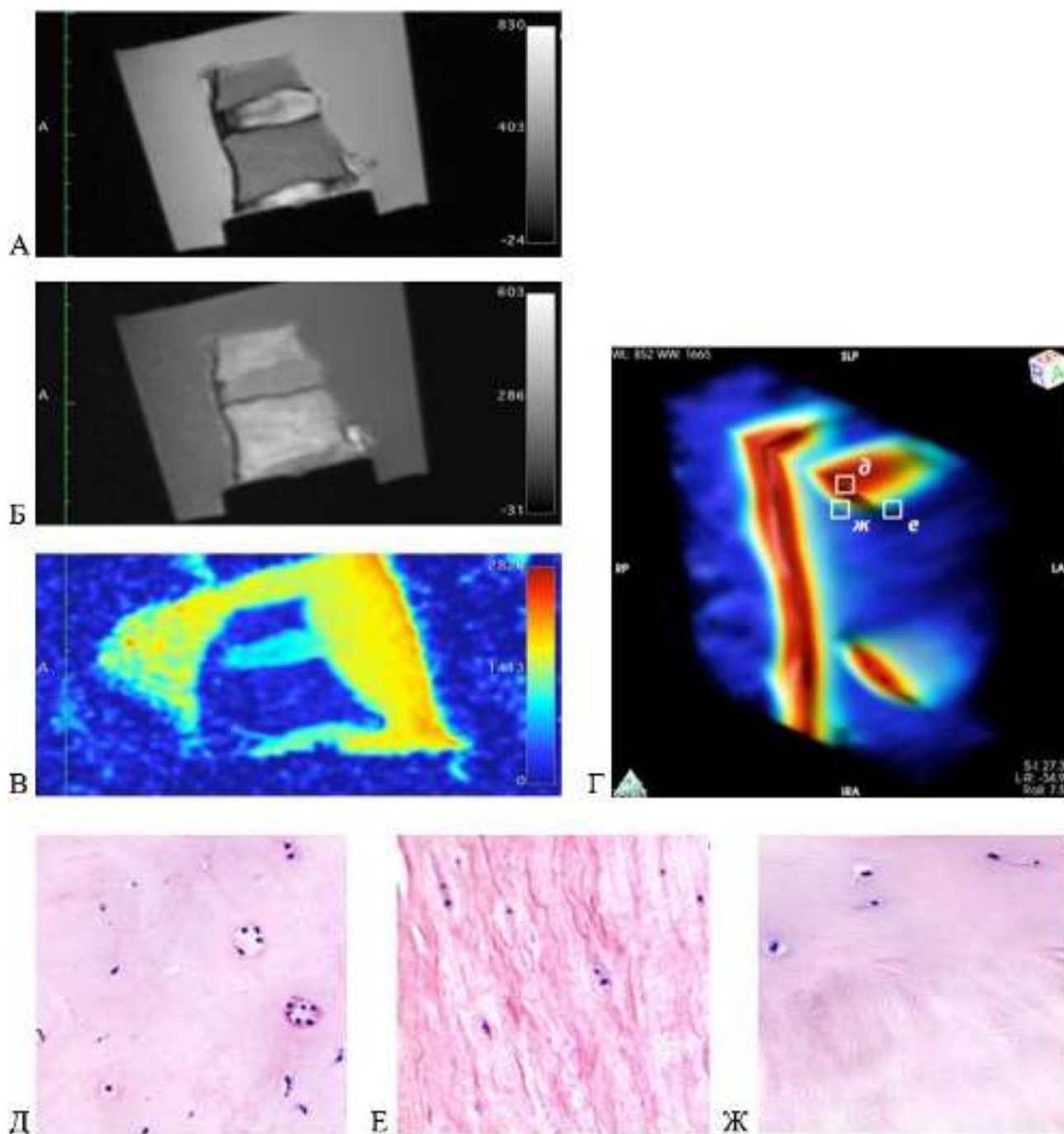


Рисунок 8 – Исследование диффузионного транспорта и клеточного состава МПД. T2 (А), T1 (Б) взвешенные изображения МПД и плоскостная карта КД (В). Трехмерная карта диффузии (Г) показывает неравномерность распределения КД по МПД (костные структуры не визуализируются). Д, Е, Ж — гистологическая картина области пульпозного ядра, фиброзного кольца и замыкательной пластинки соответственно; окрашивание гематоксилином и эозином

Таблица 2 – Значения КД и количество клеток в разных отделах МПД ($n = 8$; $M \pm SD$)

Показатель	ПОФК		ПЯ	ЗОФК	p (ПОФК- ПЯ)	p (ПОФК- ЗОФК)	p (ЗОФК- ПЯ)
Уровень центра МПД							
КД	874±177		1734±193	1343±318	0,01	0,02	0,049
Количество клеток	2342±748		1245±468	1888±423	<0,01	0,07	<0,01
Уровень замыкательной пластинки МПД							
КД	820±274		1153±259	1023±315	0,01	0,16	0,32
Количество клеток	2244±691		2551±378	3346±750	0,02	<0,01	0,04

Примечание. ПОФК – передние отделы фиброзного кольца; ПЯ – пульпозное ядро; ЗОФК – задние отделы фиброзного кольца, КД – коэффициент диффузии

В исследованиях К. Tomaszewski et al. (2015) показали, что средняя клеточная плотность для ФК, ПЯ и замыкательной пластинки при морфометрическом анализе условно здоровых МПД составляет 2333, 1894 и 1061 клеток/мм³ соответственно, что сопоставимо с результатами нашего исследования.

Морфологическое исследование операционного и аутопсийного материала позволило выявить структурные изменения, характерные для дегенерации МПД: в качестве иллюстративного примера приведено гистологическое исследование МПД пациента 39 лет с диагнозом: «Дорсопатия. Обострение. Остеохондроз пояснично-крестцового отдела позвоночника. Протрузии дисков L_{IV}-L_V, L_V-S_I. Правосторонняя фрагментированная грыжа диска L_{IV}-L_V со стенозированием позвоночного канала». Анализ методом световой микроскопии гистологических препаратов МПД на уровне L_{IV}-L_V выявил обширные зоны некроза ткани. Данные

участки характеризуются дистрофическими изменениями и коагуляционным некрозом хондроцитов, разрушением внеклеточного матрикса (Рисунок 9, А-В). При этом в задней продольной связке выявлены признаки активного продуктивного воспаления: пролиферация капилляров и фибробластов (Рисунок 9, Г)

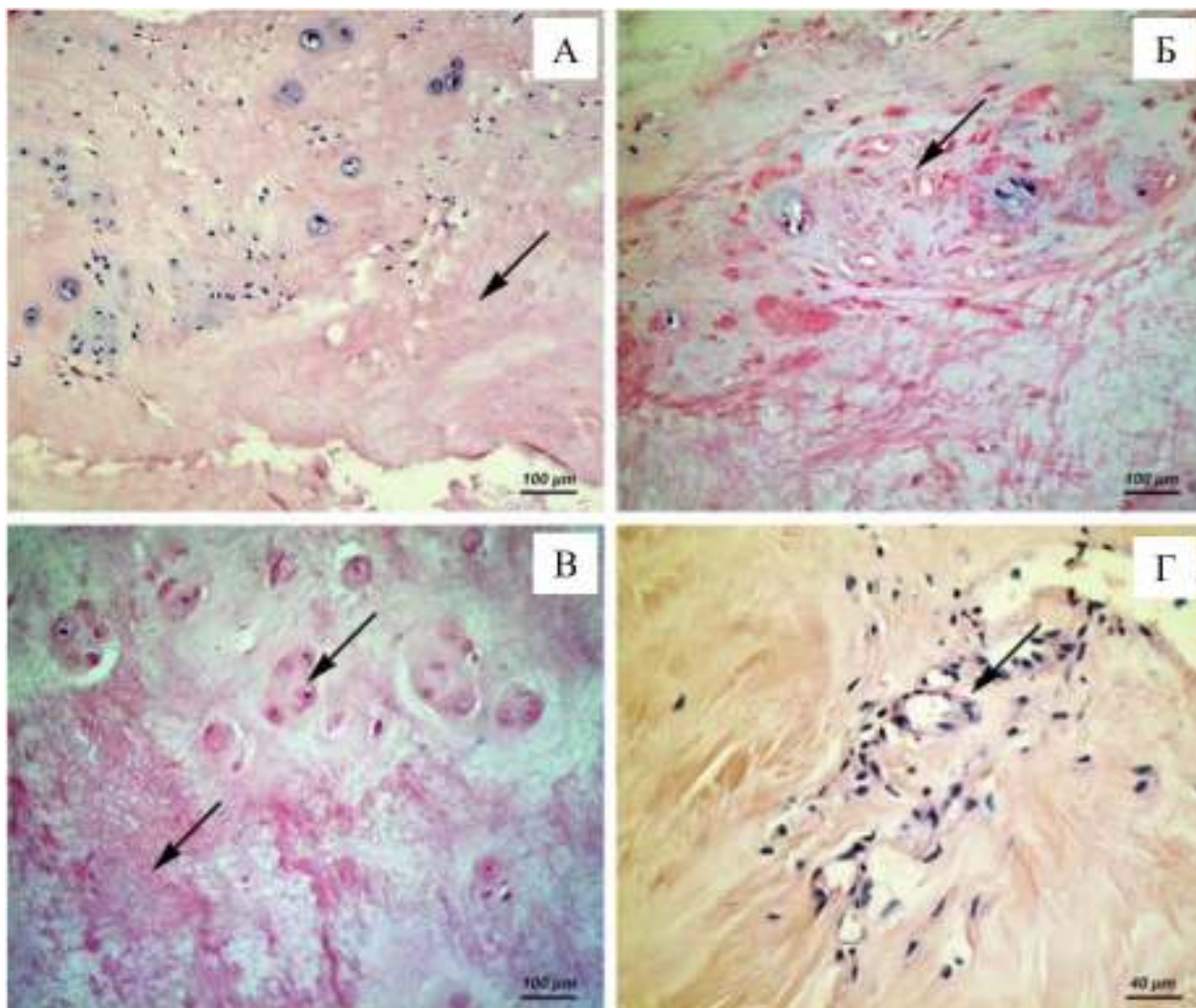


Рисунок 9 – Пример. Пациент 39 лет, гистологическое исследование межпозвонкового диска L_{IV}-L_V. Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия. А) Некроз ткани пульпозного ядра; Б) Дистрофические изменения и коагуляционный некроз хондроцитов; В) Изогруппы хондроцитов с дистрофическими изменениями, разрушение матрикса; Г) Задняя продольная связка с пролиферацией капилляров и фибробластов, продуктивное воспаление

Конфокальная микроскопия позволила изучить компоненты внеклеточного матрикса в различных отделах МПД: агрекан, коллаген I, II, X и XI α -2 типов. Спектр исследуемых типов коллагенов и агрекана в тканях дегенерированного МПД и объемы анализируемых областей МПД, занимаемых флуоресцентным сигналом ($\mu\text{м}^3$) на $1 \times 10^6 \mu\text{м}^3$ ткани, представлены на Рисунке 10.

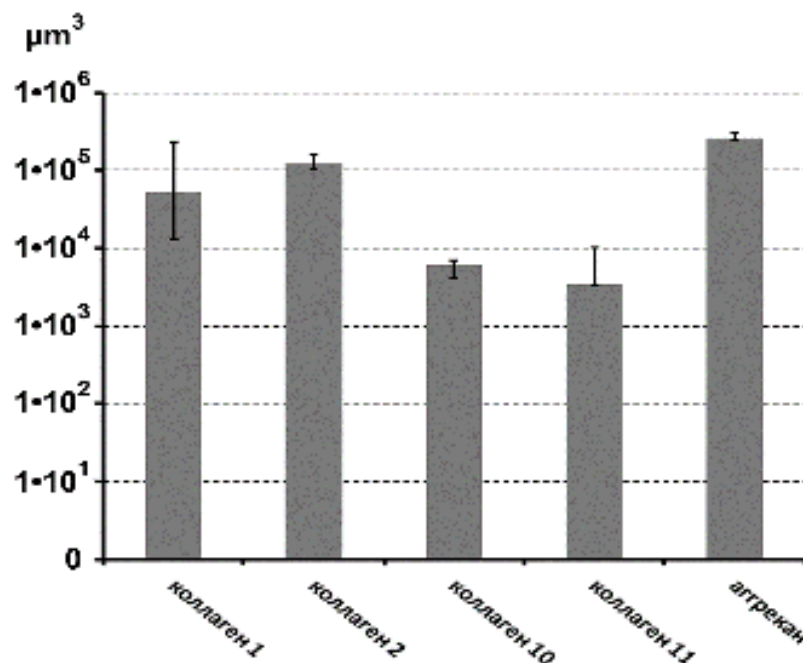


Рисунок 10 – Спектр коллагенов и агрекана в исследуемых тканях дегенерированного МПД: объемы анализируемых областей МПД, занимаемых флуоресцентным сигналом ($\mu\text{м}^3$) на $1 \times 10^6 \mu\text{м}^3$ ткани

Наибольшей распространенностью во внеклеточном матриксе МПД характеризовался агрекан, занимающий область $2,56 \times 10^5$ ($2,38 \times 10^5$; $3,07 \times 10^5$) $\mu\text{м}^3$ в $1 \times 10^6 \mu\text{м}^3$ анализируемой ткани (Рисунок 11).

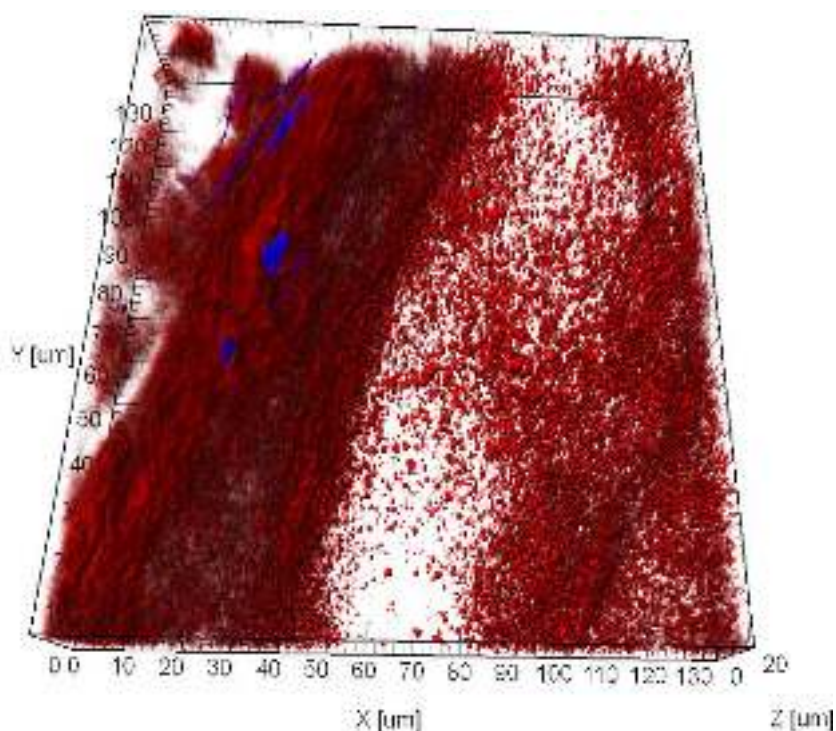


Рисунок 11 – Особенности трехмерной структуры распределения агрекана (представлен красным) в ткани МПД. Окраска ядер Hoechst 33342 (синий). Иммуногистохимическое окрашивание

Известно, что данный протеогликан является основным компонентом ПЯ МПД (Adams M.A., Roughley P.J., 2006; Roughley P. et al., 2006). Определялись участки параллельно ориентированных тонковолокнистых структур или более утолщенных с плотными пучками волокон толщиной 0,2-0,4 мкм. В некоторых наблюдениях среди волокнистых структур агрекана отмечали участки с небольшим его содержанием, при этом распределение агрекана было диффузным или в форме мелких (0,35-1,5 мкм) глыбок, составлявшее до 25 % анализируемого объема ткани МПД. Преобладание агреканов, имеющих диффузное, глыбчатое распределение в ПЯ по сравнению с ФК, обуславливает различия диффузионного транспорта. Цитоплазма клеток МПД в 80 % клеток преимущественно не окрашивалась на данный маркер. В 5 % наблюдений определялись зоны с отсутствием данного протеогликана в матриксе, тем не менее, в которых находились отдельные группы клеток с его интенсивным синтезом.

Выявленный коллаген I типа (Рисунок 12) характеризовался несколько менее интенсивным окрашиванием, чем агрекан: объем анализируемых областей МПД, занимаемых флуоресцентным сигналом, составил $5,27 \cdot 10^4$ ($1,29 \cdot 10^4$; $2,30 \cdot 10^5$) мкм^3 на $1 \cdot 10^6$ мкм^3 ткани. Выявлены зоны с параллельно или разнонаправленно ориентированными тонковолокнистыми организованными структурами. Области с диффузным и глыбчатым распределением окрашивания встречались в 70 % анализируемых Z-стеков в сравнении с агреканом. Определено наличие зон с низким содержанием коллагена I, которые составили 40 % Z-стеков при сравнении с аналогичными зонами распределения агрекана. Коллаген I типа обнаружен как в ПЯ, так и в ФК, однако гораздо более распространен в ФК.

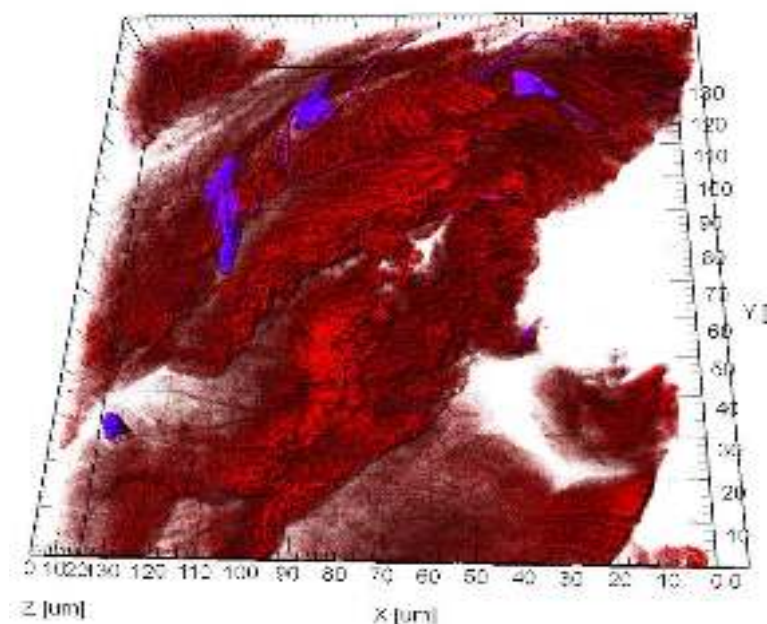


Рисунок 12 – Особенности трехмерной структуры распределения коллагена I (представлен красным) в ткани МПД. Окраска ядер Hoechst 33342 (синий). Иммуногистохимическое окрашивание

Коллаген II типа (Рисунок 13) также характеризовался менее интенсивным окрашиванием, чем агрекан, но более, чем коллаген I типа: объем областей, занимаемых флуоресцентным сигналом, составил $1,21 \cdot 10^5$ ($1,05 \cdot 10^5$; $1,60 \cdot 10^5$) мкм^3 на $1 \cdot 10^6$ мкм^3 ткани МПД. По распределению коллагена II типа анализируемые зоны определялись с аналогичной тонковолокнистой структурой,

ориентированной более разнонаправлено. Имелись также исследуемые области Z-стеков с диффузным и глыбчатым распределением окрашивания. Необходимо отметить, что в исследуемых областях Z-стеков МПД с наименьшим содержанием коллагена I и II типов, наблюдали большое количество активных клеток, синтезирующих данные белки, что, возможно, характеризует течение процессов различных фаз процесса ремоделирования ткани МПД, направленных на локальное восстановление межклеточного матрикса (Duance V.C. et al., 1998).

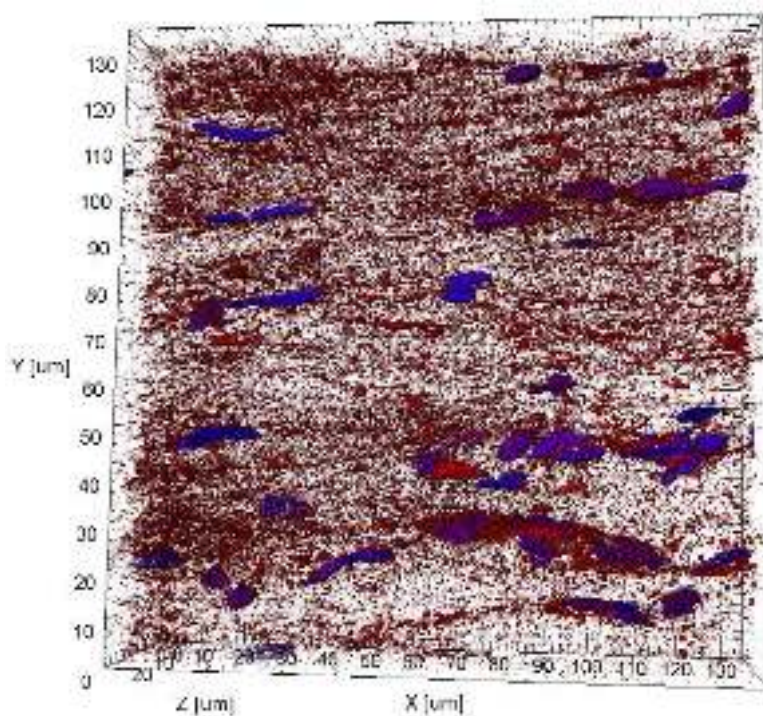


Рисунок 13 – Особенности трехмерной структуры распределения коллагена II (представлен красным) в ткани МПД. Окраска ядер Hoechst 33342 (синий). Иммуногистохимическое окрашивание

Коллаген X типа (Рисунок 14) также характеризовался менее интенсивным окрашиванием, чем агрекан, и присутствовал преимущественно в цитоплазме клеток анализируемых образцов ткани МПД. Объем флуоресцентного сигнала коллагена X типа в Z-стеках составил $6,09 \cdot 10^3$ ($4,15 \cdot 10^3$; $6,87 \cdot 10^3$) $\mu\text{км}^3$ на $1 \cdot 10^6$ $\mu\text{км}^3$ ткани МПД. Нами показано, что данный белок отсутствует в образцах МПД с начальной степенью дегенерации, а его появление было более характерно для

дегенеративного процесса умеренной степени, что согласуется с литературными данными (Boos N. et al., 1997). Известно, что продукция коллагена X типа характерна преимущественно для процесса гипертрофии ткани хряща. Когда хондроциты теряют способность продуцировать коллаген II, VI, IX, XI и протеогликаны, они активируют синтез коллагена X типа (Boos N. et al., 1997).

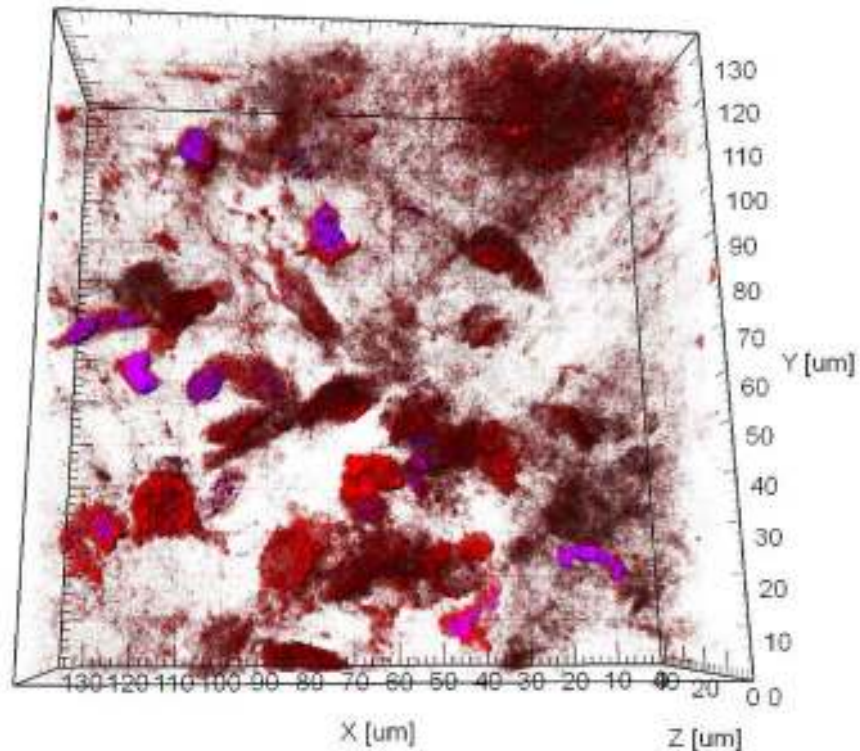


Рисунок 14 – Синтез коллагена X типа хондроцитами пульпозного ядра МПД. Окраска ядер Hoechst 33342 (синий). Иммуногистохимическое окрашивание

Коллаген XI α -2 (Рисунок 15) был идентифицирован в МПД трех пациентов в данной серии исследований.

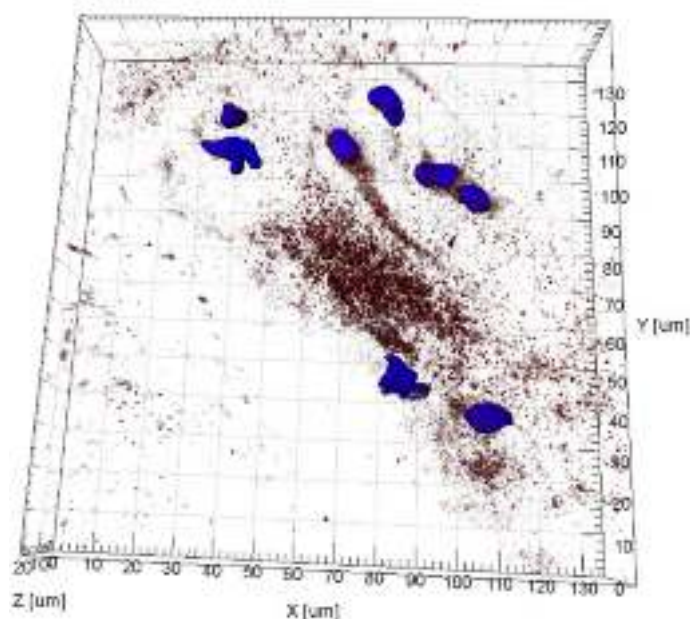


Рисунок 15 – синтез коллагена XI типа хондроцитами пульпозного ядра МПД. Окраска ядер Hoechst 33342 (синий). Иммуногистохимическое окрашивание

Объем анализируемых областей Z-стеков МПД, занимаемых флуоресцентным сигналом коллагена XI типа составил $3,40 \cdot 10^3$ ($3,27 \cdot 10^3$; $1,0 \cdot 10^4$) мкм^3 на $1 \cdot 10^6$ мкм^3 ткани, что менее, чем распределение коллагенов I, II и X типов. Коллаген XI типа преимущественно не идентифицировался в основном объеме ткани МПД и определялся в основном в диффузно окрашенных зонах внеклеточного матрикса, содержащих скопления клеток. Коллаген XI типа, хотя и обнаружен в небольших количествах в ПЯ и ФК, важен для структурной поддержки коллагена II типа, а также для формирования связей между протеогликанами и коллагеном (Kerler C.K. et al., 2012; Mayer J.E. et al., 2013). Известно, что коллагены V и XI типа формируют гибридные фибриллы с коллагеном II типа и регулирует сборку фибрилл (Wu J.J. et al., 2009; Sivan, S.S. et al., 2013). В 2009 году Videman et al. опубликовали данные о пяти различных полиморфизмах генов коллагена XI, которые были ассоциированы с риском грыжеобразования МПД. В исследовании приняли 588 близнецов мужского пола

от 35 до 70 лет. Достоверность данного заключения была позже подтверждена и другой группой исследователей (Rajasekaran S. et al., 2015).

В МПД с высоким показателем диффузии (среднее КД ПЯ $1784 \pm 193 \cdot 10^{-6}$ мм²/с) трехмерная структура компонентов межклеточного матрикса имела в основном диффузную, реже – упорядоченную волокнистую форму, ориентированную в разном порядке. При этом в этих образцах не выявлен коллаген X и XI типов, что соответствует антигенному спектру матрикса нормального МПД. В 2 образцах МПД с умеренной степенью дегенерации (III степень по Pfirrmann, КД $1215 \pm 345 \cdot 10^{-6}$ мм²/с) определялись коллаген X и XI типов, хондроциты с признаками дистрофии.

МПД со значением КД $> 1500 \cdot 10^{-6}$ мм² ($n = 3$) были исследованы методом трансмиссионной электронной микроскопии для оценки их ультрамикроструктуры (Рисунок 16). Это позволило определить в ткани МПД отдельные, хорошо сохраненные клетки, среди которых располагались многочисленные, разнообразно ориентированные нити коллагена с разной степенью структурной организации (Рисунок 17). Плотные пучки микрофибрилл толщиной 5-7 нм имели длину от 0,1 до 1,5 мкм. Менее многочисленные высокополимеризованные формы коллагена представлены фибриллами толщиной 40-70 нм и длиной 0,5-2,5 мкм.

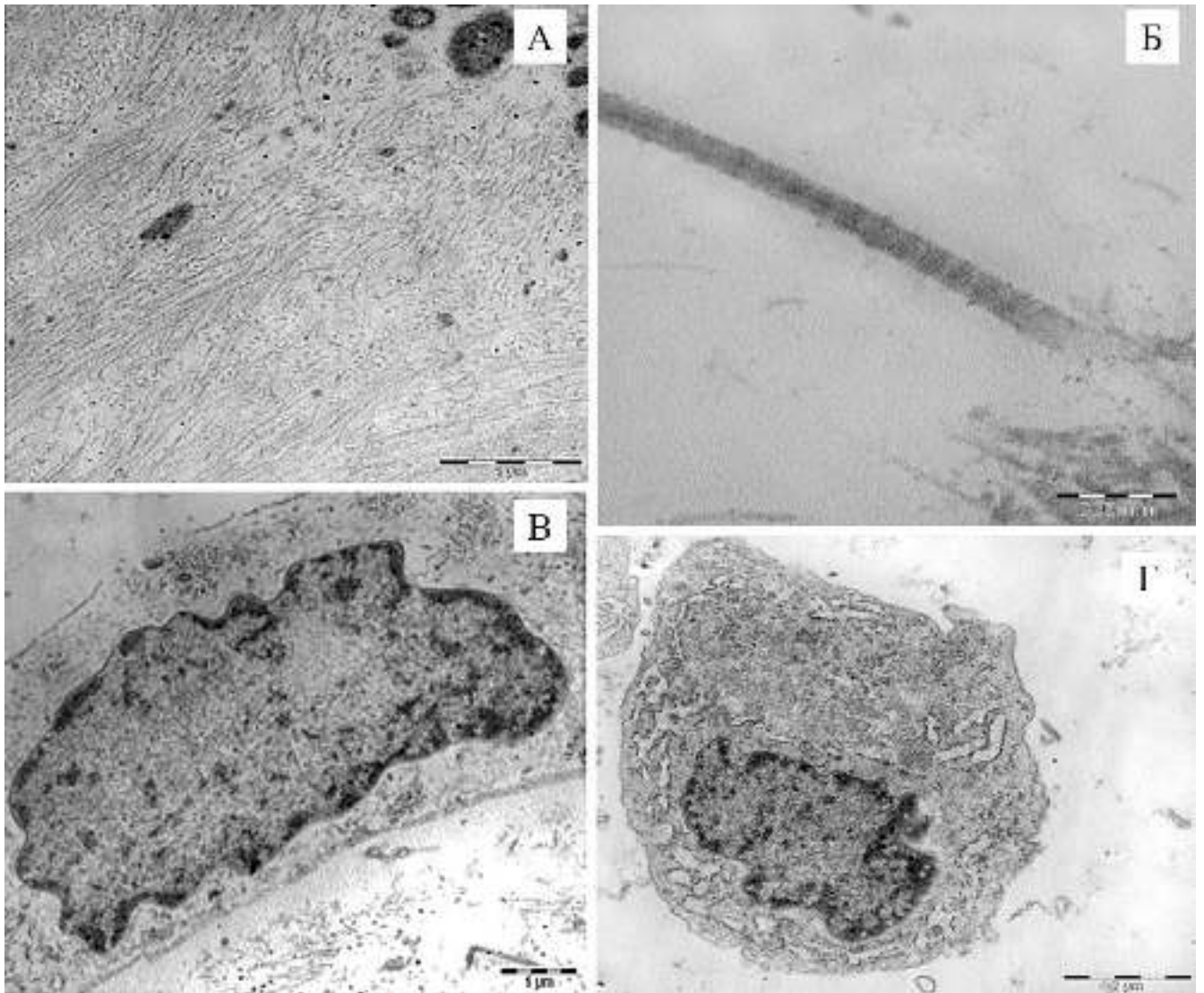


Рисунок 16 – Визуализация ультраструктуры области фиброзного кольца МПД с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Определяются разнонаправленные слои пучков коллагеновых волокон, одного из основных структурных компонентов внеклеточного матрикса фиброзного кольца МПД (А, Б), отдельная фибрилла коллагена II (Б), ультраструктура клеток (В, Г)

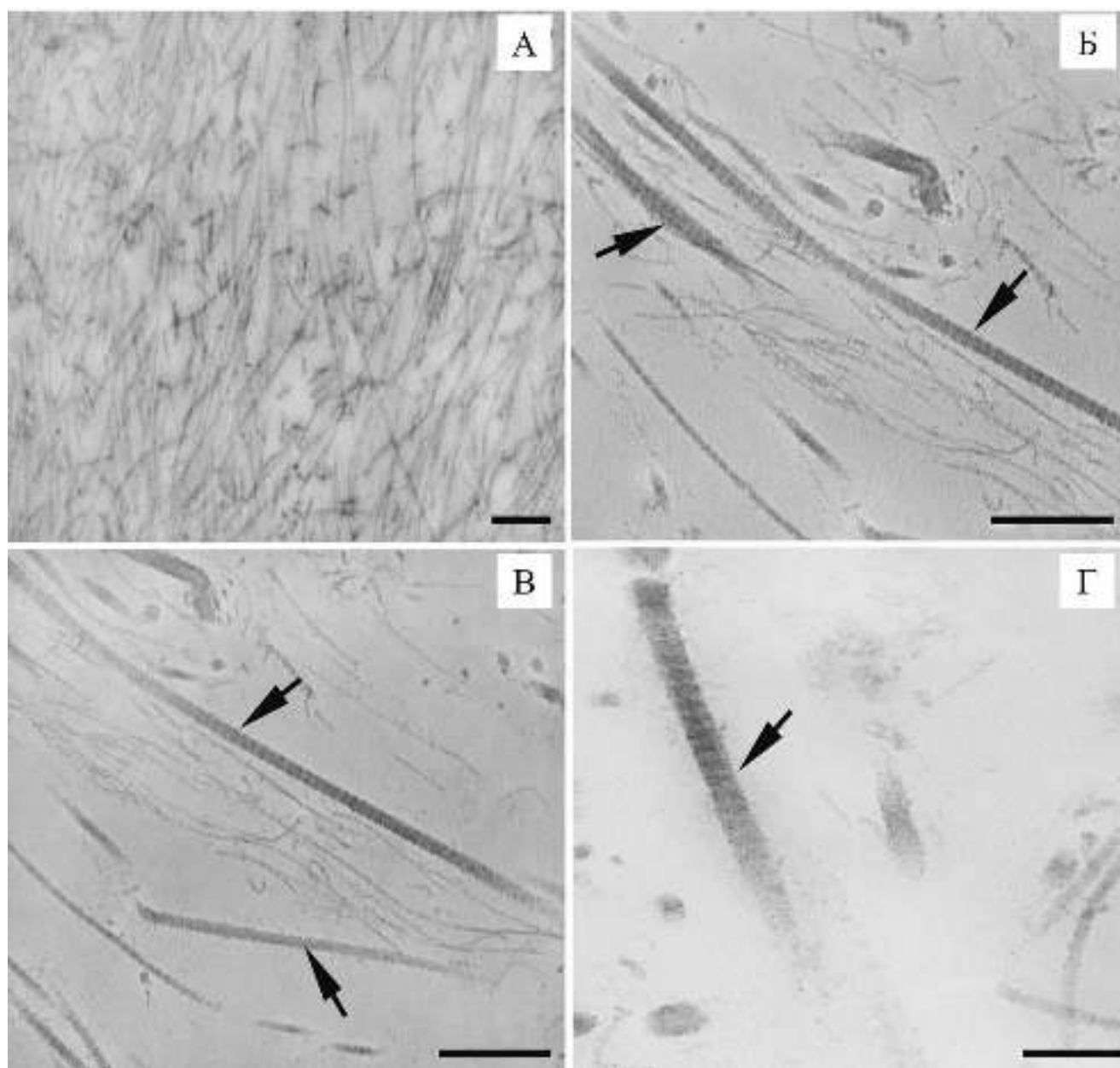


Рисунок 17 – Пульпозное ядро дегенерированного МПД с различным уровнем полимеризации коллагена. А– мелкие различным образом ориентированные формы коллагена; Б, В, Г – крупные высокополимеризованные формы коллагена (отмечены стрелками). Масштаб: А – 0,2 мкм; Б, В – 500 мкм; Г – 0,2 мкм

Таким образом, диффузионный транспорт в области ПЯ, задних отделов ФК, а также в области замыкательной пластинки на уровне задних отделов ФК МПД в значимой степени ассоциирован с клеточной плотностью. Анализ областей ПЯ и ФК МПД методами лазерной конфокальной и трансмиссионной микроскопии подтвердил взаимосвязь значения КД и состояния МПД: при значении КД ПЯ

менее $15 \cdot 10^{-4}$ мм²/с в ткани МПД определялись морфологические и иммуногистохимические признаки дегенерации. Результаты проведенного исследования дополняют ранее полученные в клинических (Kealey S.M. et al., 2005; Niinimaki J. et al., 2009) и экспериментальных работах (Wang A.M. et al., 2015) представления об изменениях диффузионного транспорта при дегенерации МПД. При длительных механических воздействиях на МПД происходит дегидратация его структур и как следствие уменьшаются значения КД (Antoniou J et al., 2014). Кроме того, при воздействии больших нагрузок на МПД его клетки начинают активно продуцировать провоспалительные цитокины, матриксные металлопротеиназы и агреканы, которые в свою очередь способствуют активации воспаления и последующей дегенерации межклеточного вещества, главным образом агреканов (Roughley P.J., 2004; Adams M.A., Roughley P.J., 2006; Risbud M.V., Shapiro I.M., 2014). Снижение уровня агреканов в ПЯ ведет к его дегидратации и запускает процессы дегенерации МПД (Дедух Н.В., 2012; Iozzo R.V., Schaefer L., 2015). Совокупность значений КД образует функциональную диффузионную карту, которая позволяет комплексно оценить функциональное состояние молекулярной диффузии МПД (Kealey S.M. et al., 2005; Niinimaki J. et al., 2009). КД зависит, главным образом, от перфузии тканей и движения молекул воды внеклеточного вещества. Доказано, что снижение значений КД на начальных стадиях дегенерации МПД связано с уменьшением содержания внеклеточных полисахаридов и свободных молекул воды в ПЯ и ФК, а выраженное снижение КД ассоциировано с нарушением целостности структур МПД (Niinimaki J. et al., 2009; Antoniou J et al., 2014). В проведенном нами исследовании применение метода ДВ МРТ с определением КД позволило объективно охарактеризовать диффузию в МПД на тканевом уровне, которая коррелировала с ранними морфологическими и ультраструктурными признаками дегенеративно-дистрофического поражения МПД.

3.2. Исследование влияния провоспалительных цитокинов на клетки межпозвонкового диска

3.2.1. Анализ уровня секреции цитокинов при сокультивировании клеток линии ТНР-1 и клеток межпозвонкового диска

Анализ секреции цитокинов неповрежденными и дегенерированными клетками ПЯ и ФК. При исследовании уровня секреции цитокинов клетками неповрежденного и дегенерированного МПД выявлено, что клетки неповрежденного ПЯ секретируют значительно больше ИЛ-6 по сравнению с клетками дегенерированного ПЯ ($11,36 \pm 3,58$ и $4,09 \pm 0,36$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$). Секреция ИЛ-8 клетками дегенерированного ПЯ была в 20 раз выше, чем неповрежденного ($604,39 \pm 166,49$ и $29,18 \pm 5,23$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$) (Рисунок 18).

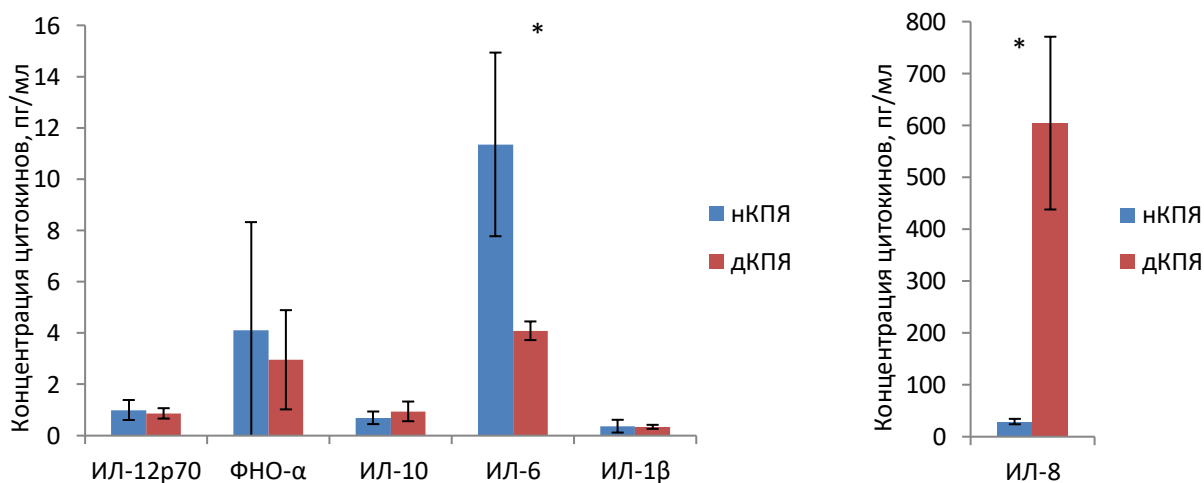


Рисунок 18 – Анализ уровня секреции цитокинов ИЛ-12p70, ФНО-α, ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-1β и ИЛ-8 клетками неповрежденного (нКПЯ) и дегенерированного (дКПЯ) ПЯ. * – $p < 0,05$

При сравнении групп клеток неповрежденного и дегенерированного ФК выявлены статистически значимые различия в уровне секреции ИЛ-12p70, ИЛ-10 и ИЛ-8 ($1,07 \pm 0,04$ и $0,68 \pm 0,22$ пг/мл, $1,41 \pm 0,23$ и $0,59 \pm 0,05$ пг/мл, $137,83 \pm 48,39$ и $377,29 \pm 34,37$ пг/мл соответственно в группах неповрежденных и

дегенерированных клеток ФК, $p < 0,05$) (Рисунок 19). В исследовании J. Sutovsky и соавт. (2017), где оценку уровня провоспалительных цитокинов проводили напрямую из образцов тканей ПЯ и ФК дегенерированных МПД, отмечен повышенный уровень содержания ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α . Проведенный нами анализ уровня продукции ФНО- α в группах клеток дегенерированного ФК по сравнению с таковыми неповрежденного не показал статистически значимого различия ($p = 0,33$).

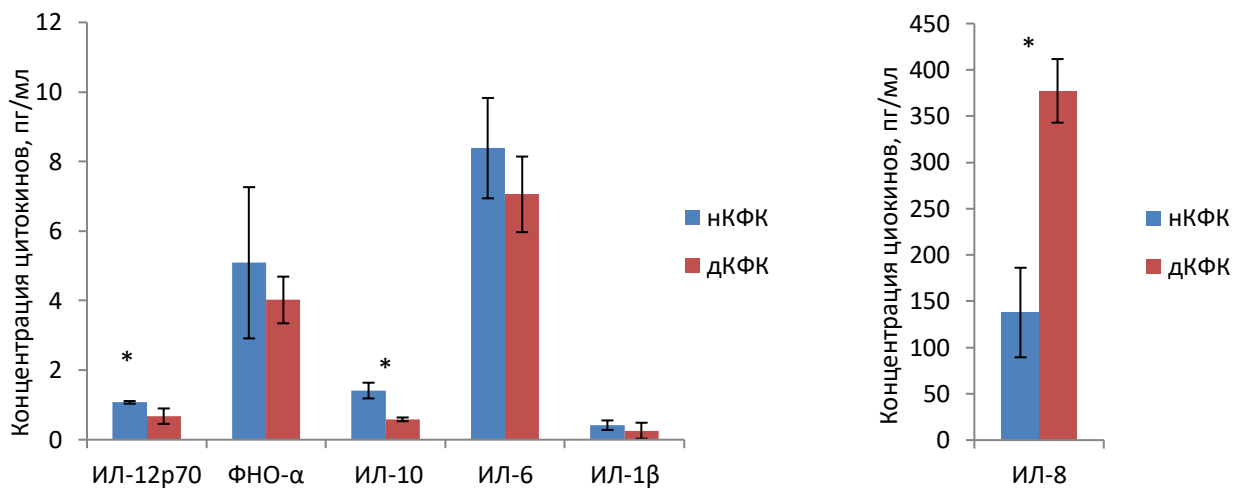


Рисунок 19 – Анализ уровня секреции цитокинов ИЛ-12p70, ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-6, ИЛ-1 β и ИЛ-8 клетками неповрежденного (нКФК) и дегенерированного(дКФК) ФК. * - $p < 0.05$

Анализ секреции цитокинов клетками линии ТНР-1. Установлено, что моноцитоподобные клетки линии ТНР-1 спонтанно секретировали ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ИЛ12p70. Стимуляция форбол-12-миристат-13-ацетатом способствовала усилению секреции данных цитокинов активированными клетками линии ТНР-1. Установлено статистически значимое увеличение уровня цитокинов в среде активированных клеток ТНР-1 под влиянием по сравнению со спонтанным уровнем их секреции клетками ТНР-1: ИЛ-10 ($0,87 \pm 0,3$ пг/мл – ТНР-1; $1,75 \pm 0,14$ пг/мл – аТНР-1, $p < 0,05$), ИЛ-6 ($0,33 \pm 0,24$ пг/мл – ТНР-1; $11,33 \pm 5,21$ пг/мл – аТНР-1, $p < 0,05$), ИЛ-1 β ($0,41 \pm 0,28$ пг/мл – ТНР-1; $121,89 \pm 44,67$ пг/мл – аТНР-1, $p < 0,05$), ИЛ-8 ($13,62 \pm 9$ пг/мл – ТНР-1; $18581,81 \pm 3480,3$ пг/мл – аТНР-1,

$p < 0,05$) (Рисунок 20).

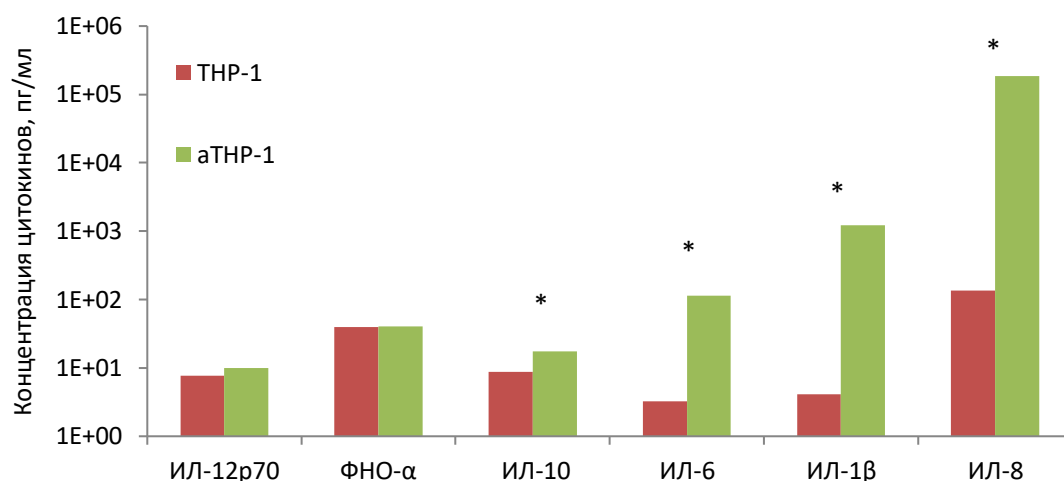


Рисунок 20 – Сравнительный анализ уровня цитокинов, секретируемых моноцитоподобными ТНР-1 клетками и активированными ТНР-1 клетками (аТНР-1) под влиянием форбол-12-миристан-13-ацетата. Достоверность различий между группами: * – $p < 0.05$ аТНР-1 в сравнении с ТНР-1

Анализ уровня секреции цитокинов при совместном культивировании клеток линии ТНР-1 и клеток МПД человека. Данные мультиплексного анализа показали достоверное увеличение уровня цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-8 во всех группах сокультивирования клеток МПД и активированных ТНР-1 клеток ($p < 0,05$ во всех группах). Уровень секреции ИЛ-6 показал статистически значимое снижение в группе сокультивирования неповрежденных клеток ПЯ с активированными клетками ТНР-1 по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Выявлено отсутствие значимых различий в уровне ИЛ-12p70, ФНО-α и тенденция к значимости различий в уровне ИЛ-10 в группах неповрежденных и дегенерированных клеток ПЯ и ФК по сравнению с группами сокультивирования клеток ПЯ и ФК с активированными клетками ТНР-1 ($p_{ANOVA} = 0,80$, $p_{ANOVA} = 0,33$ и $p_{ANOVA} = 0,052$ соответственно) (Таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительный анализ уровня цитокинов в группах клеток неповрежденных и дегенерированных ПЯ и ФК при сокультивировании с активированными клетками линии ТНР-1 (пг/мл)

Цито- кины	Неповрежденные				Дегенерированные			
	клетки ПЯ		клетки ФК		клетки ПЯ		клетки ФК	
	контроль	сокультиви- рование	контроль	сокультиви- рование	контроль	сокультиви- рование	контроль	сокультиви- рование
ИЛ-12p70	1,00±0,39	1,11±0,57	1,07±0,04	0,89±0,31	0,87±0,2	0,96±0,65	0,68±0,22	0,82±0,18
ФНО-α	4,1±4,23	11,17±6,8	5,09±2,17	5,24±1,28	2,96±1,93	6,82±5,06	4,02±0,67	7,6
ИЛ-10	0,7±0,24	0,79±0,45	1,41±0,23	0,99±0,18	0,95±0,38	0,98±0,43	0,59±0,05	0,62±0,27
ИЛ-6	11,36±3,58	4,82±1,02*	8,38±1,44	7,52±3,68	4,09±0,36	6,35±3,22	7,06±1,09	8,00±2,06
ИЛ-1β	0,37±0,25	2,63±0,38*	0,42±0,14	2,37±0,51*	0,34±0,08	2,47±0,31*	0,26±0,23	2,94±0,76*
ИЛ-8	28,18±5,23	538,16±102,4*	137,83±48,39	560,05±12,82*	604,39±166,49	1668,51±1097,84*	377,29±34,37	693,48±56,74*

Примечание: *– $p < 0,05$ группа сокультивирования с аТНР-1 клетками в сравнении с соответствующей группой контроля. Для расчета критерия p использован post-hoc Mann-Whitney U тест.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что сокультивирование клеток МПД в трехмерной культуре с активированными клетками линии ТНР-1 является состоятельной *in vitro* моделью для изучения влияния комплекса провоспалительных цитокинов на клетки МПД, что соответствует целям эксперимента. Данные мультиплексного анализа уровня секреции цитокинов показали достоверное увеличение уровня цитокинов ИЛ-1 β во всех группах сокультивирования клеток МПД с активированными ТНР-1 клетками, что является одним из факторов, обуславливающих миграцию макрофагов в МПД (Wang J. et al., 2013). ИЛ-1 β играет важную роль в дегенерации МПД, поскольку способствует активации ферментативной деградации внеклеточного матрикса МПД (Le Maitre C.L. et al., 2007). Повышенное содержание ИЛ-8 отмечено в тканях дегенерированного МПД по сравнению с таковым неповрежденным и положительно коррелирует со степенью дегенерации (Phillips K.L. et al., 2013). Известно также, что увеличение уровня секреции ИЛ-8 отмечается при изолированном воздействии ФНО- α на клетки ПЯ (Walter B.A. et al., 2015). Наше исследование показало, что клетки ФК и ПЯ дегенерированных МПД продуцируют значительное количество ИЛ-8 как спонтанно, так и при совместной культивации с макрофагоподобными клетками, что соответствует данным литературы (Takada T.K. et al., 2012; Moon H.J. et al., 2014).

3.2.2. Исследование продукции лактата клетками межпозвонкового диска под воздействием провоспалительных цитокинов

Адекватное поступление глюкозы клеткам МПД необходимо для поддержания их преимущественно анаэробного метаболизма; кроме того, глюкоза также участвует в построении макромолекул межклеточного матрикса (Bibby S.R. et al., 2004; Mobasheri A., 2012; Sopasakis V.R. et al., 2018). Клетки МПД используют глюкозу для производства АТФ с молочной кислотой в качестве получаемого метаболита, поэтому концентрации глюкозы и молочной кислоты тесно связаны. Для изучения влияния провоспалительных цитокинов на нутритивный статус клеток МПД на модели сокультивирования неповрежденных и дегенерированных клеток МПД с активированными макрофагоподобными клетками оценен уровень продукции лактата.

Анализ продукции лактата неповрежденными и дегенерированными клетками ПЯ и ФК. При анализе продукции лактата клетками неповрежденного и дегенерированного МПД выявлено, что клетки дегенерированного ФК выделяют достоверно меньше лактата по сравнению с клетками неповрежденного ФК ($5,65 \pm 0,39 \cdot 10^{-4}$ и $6,79 \pm 0,56 \cdot 10^{-4}$ нмоль/(кл*ч) соответственно, $p < 0,05$). При сравнении продукции лактата клетками дегенерированного и неповрежденного ПЯ выявлено отсутствие статистически значимых различий ($5,62 \pm 0,46 \cdot 10^{-4}$ и $4,82 \pm 0,32 \cdot 10^{-4}$ нмоль/(кл*ч) соответственно, $p = 0,8$) (Рисунок 21).

При сравнении продукции лактата клетками неповрежденного МПД выявлено, что клетки ФК выделяют достоверно больше лактата, чем клетки ПЯ ($6,79 \pm 0,56 \cdot 10^{-4}$ и $4,82 \pm 0,32 \cdot 10^{-4}$ нмоль/(кл*ч) соответственно, $p < 0,05$) (Рисунок 21). В дегенерированном МПД уровень продукции лактата был снижен и оказался одинаковым для обоих типов клеток ($5,62 \pm 0,46 \cdot 10^{-4}$ нмоль/(кл*ч) – КПЯ и $5,65 \pm 0,39 \cdot 10^{-4}$ нмоль/(кл*ч) – КФК, $p = 0,83$).

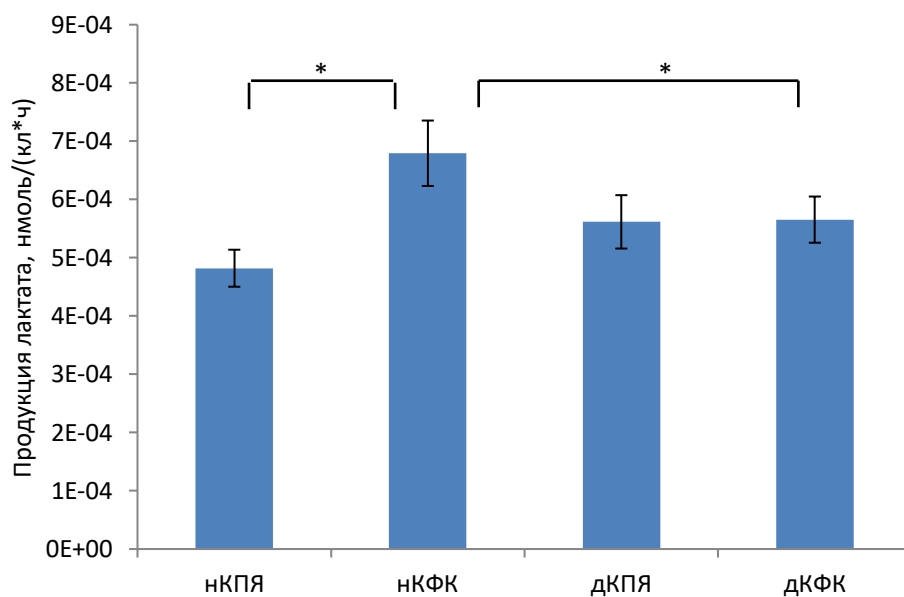


Рисунок 21 – Сравнительный анализ уровня продукции лактата в группах неповрежденных (н) и дегенерированных (д) клеток ПЯ (КПЯ) и ФК (КФК). * – $p < 0.05$

Анализ уровня лактата в группах неповрежденных и дегенерированных клеток МПД при сокультивировании с активированными клетками линии ТНР-1. Выявлено статистически значимое увеличение уровня продукции лактата в группах сокультивирования неповрежденных клеток ПЯ и ФК с активированными ТНР-1 клетками по сравнению с соответствующими контрольными группами ($5,93 \pm 0,15 \cdot 10^{-4}$ и $4,82 \pm 0,32 \cdot 10^{-4}$ нмоль / (кл*ч) соответственно для клеток ПЯ, $p < 0.05$; $8,79 \pm 1,18 \cdot 10^{-4}$ и $6,79 \pm 0,56 \cdot 10^{-4}$ нмоль / (кл*ч) соответственно для клеток ФК, $p < 0.05$) (Рисунок 22). В группах сокультивирования клеток дегенерированных ПЯ и ФК с активированными ТНР-1 клетками по сравнению с соответствующими им монокультурами также выявлены статистически значимые различия ($7,64 \pm 0,78 \cdot 10^{-4}$ и $5,62 \pm 0,46 \cdot 10^{-4}$ нмоль / (кл*ч) соответственно для групп дегенерированных клеток ПЯ, $p < 0.05$; $8,58 \pm 1,05 \cdot 10^{-4}$ и $5,65 \pm 0,39 \cdot 10^{-4}$ нмоль / (кл*ч) соответственно для групп дегенерированных клеток ФК, $p < 0.05$).

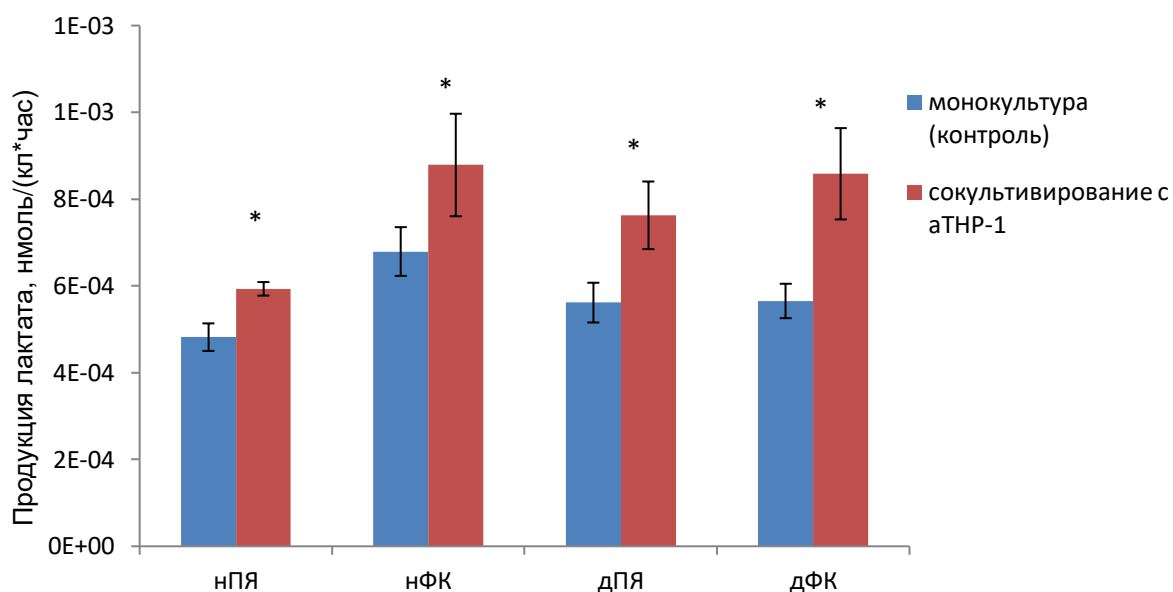


Рисунок 22 – Сравнительный анализ уровня продукции лактата в группах неповрежденных и дегенерированных клеток МПД при сокультивировании с активированными клетками ТНР-1 (а ТНР-1) и в монокультуре. * – $p < 0.05$

В проведенном нами исследовании показано, что клетки ФК неповрежденного МПД выделяют достоверно больше лактата, чем клетки ПЯ. Полученные результаты согласуются с данными исследования J.C. Salvatierra и соавт. (2011) о различиях энергетического метаболизма клеток неповрежденных ПЯ и ФК. Поскольку синтез компонентов межклеточного матрикса МПД является энергоемким процессом, поступление питательных веществ и обеспечение энергией клеток имеют решающее значение в поддержании здоровья диска. Клетки ПЯ потребляют меньше глюкозы и вырабатывают гораздо больше АТФ, что указывает на вероятное продуцирование АТФ клетками ПЯ через аэробное дыхание в дополнение к гликолизу (Wang C. et al., 2013). В то же время, проведенное нами исследование показало, что в дегенерированном МПД уровень продукции лактата был снижен по сравнению с неповрежденным. При этом различий в уровне продукции лактата между клетками ПЯ и ФК дегенерированного МПД уже не наблюдалось. В группах сокультивирования клеток МПД и активированных ТНР-1

выявлено значимое повсеместное увеличение продукции лактата клетками МПД по сравнению с соответствующими контрольными группами.

Необходимо отметить ряд ограничений проведенного эксперимента. В данном исследовании, как и в ряде других (Hwang M.H. et al., 2015; Kim J.H. et al., 2008; Kluba T. et al., 2005), культивирование проводилось при стандартных для клеточных культур концентрациях кислорода и глюкозы, которые отличаются от нативных условий клеток МПД *in vivo*. В частности, существующие вследствие аваскулярности МПД градиенты концентрации кислорода и глюкозы могут изменять локальный метаболизм клеток. Схожих с нашим исследованием на клетках МПД человека нами не обнаружено, однако наиболее близким является *in vitro* исследование V.R. Sopasakis и соавт. (2018), в котором определяли уровень продукции лактата хондроцитами суставного хряща лошади, культивированными с добавлением ИЛ-1 β , в питательных средах с двумя различными концентрациями глюкозы – 5 и 25 мМ. Так, продукция лактата хондроцитами, культивированными без добавления ИЛ-1 β , была одинаковой вне зависимости от уровня концентрации глюкозы в питательной среде. Под действием ИЛ-1 β продукция лактата хондроцитами значимо увеличивалась. Интересно отметить, что данные изменения наблюдались только в условиях стандартной для культивирования клеток концентрации глюкозы (25 мМ), а при недостатке уровня глюкозы (что соответствует гипогликемическим условиям хондроцитов *in vivo*), значимых различий обнаружено не было. В другом исследовании оценивали скорость потребления радиоактивной глюкозы [^3H]2DG хондроцитами суставного хряща человека под влиянием ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6. Авторы показали, что провоспалительные цитокины значительно увеличивали захват глюкозы исследуемыми клетками (Shikhman A.R. et al., 2001). Нами установлено, что в группах сокультивирования клеток МПД с макрофагоподобными клетками линии ТНР-1 наблюдается статистически значимое повсеместное снижение продукции лактата клетками как неповрежденных, так и дегенерированных ПЯ и ФК по сравнению с соответствующими им группами контроля. Таким образом, вместе с данными литературы результаты исследования, проведенного нами на культурах

клеток человека, свидетельствуют о потенциале значительного увеличения метаболизма клеток МПД в условиях достаточной доступности глюкозы путем активации гликолиза под действием провоспалительных цитокинов, что очень важно для понимания механизмов патогенеза дегенерации МПД.

3.2.3. Исследование синтетической активности клеток межпозвонкового диска под воздействием провоспалительных цитокинов

Анализ продукции ГАГ неповрежденными и дегенерированными клетками ПЯ и ФК. Тест с 1,9-диметил-метиленовым голубым показал снижение уровня продукции ГАГ в 1,4 раза клетками дегенерированного ПЯ по сравнению с клетками неповрежденного ($6,01 \pm 0,38 \cdot 10^{-3}$ и $4,24 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ нг/клетка соответственно, $p < 0,05$). Уровень продукции ГАГ клетками дегенерированного ФК также был достоверно ниже, чем неповрежденного ФК ($4,26 \pm 0,31 \cdot 10^{-3}$ и $5,44 \pm 0,05 \cdot 10^{-3}$ нг/клетка соответственно, $p < 0,05$) (Рисунок 22).

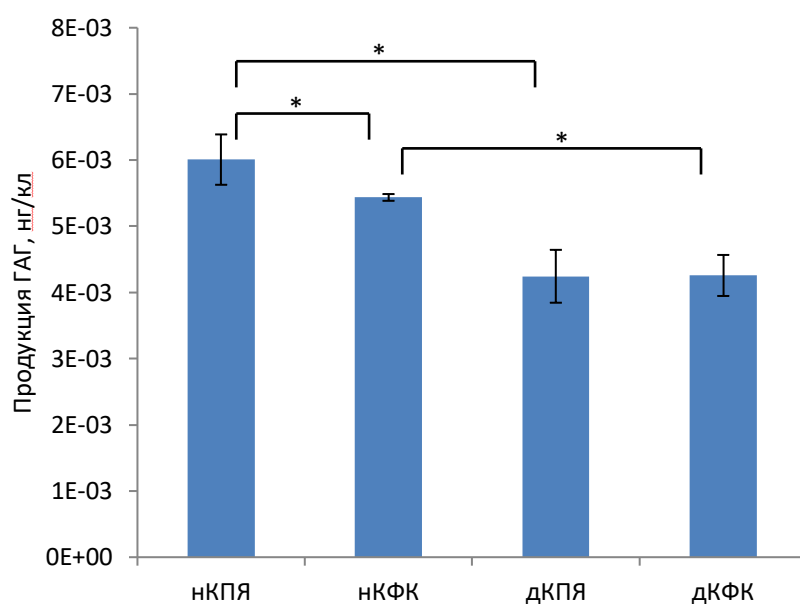


Рисунок 23 – Сравнительный анализ уровня продукции ГАГ в группах неповрежденных (н) и дегенерированных (д) клеток ПЯ (КПЯ) и ФК (КФК). * – $p < 0.05$

Проведено сравнение уровня продукции ГАГ между типами клеток МПД. Выявлено, что клетки неповрежденного ПЯ синтезируют достоверно большее количество ГАГ, чем клетки неповрежденного ФК ($6,01 \pm 0,38 \cdot 10^{-3}$ и $5,44 \pm 0,05 \cdot 10^{-3}$ нг/клетка соответственно, $p < 0,05$). При дегенерации МПД синтез ГАГ снижается обоими типами клеток МПД, при этом значимых различий в уровне продукции ГАГ дегенерированными клетками ПЯ и ФК уже не наблюдается ($4,24 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ нг/клетка – для клеток ПЯ и $4,26 \pm 0,31 \cdot 10^{-3}$ нг/клетка – для клеток ФК, $p = 0,83$) (Рисунок 23).

Анализ уровня продукции ГАГ в группах неповрежденных и дегенерированных клеток МПД при сокультивировании с активированными клетками линии ТНР-1. Установлено статистически значимое снижение уровня продукции ГАГ в группе сокультивирования клеток неповрежденного ПЯ по сравнению с группой контроля ($3,85 \pm 0,21 \cdot 10^{-3}$ и $6,01 \pm 0,38 \cdot 10^{-3}$ нг/клетка соответственно, $p < 0,05$) (Рисунок 24). В группе сокультивирования клеток дегенерированного ПЯ с активированными клетками линии ТНР-1 также выявлено статистически значимое снижение количества ГАГ по сравнению с контролем ($2,84 \pm 0,41 \cdot 10^{-3}$ и $4,24 \pm 0,4 \cdot 10^{-3}$ нг/клетка соответственно, $p < 0,05$). В группе сокультивирования клеток неповрежденного ФК с активированными ТНР-1 клетками продукция ГАГ снизилась почти в 2 раза по сравнению с группой контроля ($2,95 \pm 0,18 \cdot 10^{-3}$ и $5,44 \pm 0,05 \cdot 10^{-3}$ нг/клетка соответственно, $p < 0,05$), а в группе сокультивирования клеток дегенерированного ФК по сравнению с контролем – более чем в 2 раза ($1,99 \pm 0,33 \cdot 10^{-3}$ и $4,26 \pm 0,31 \cdot 10^{-3}$ нг/клетка соответственно, $p < 0,05$) (Рисунок 24).

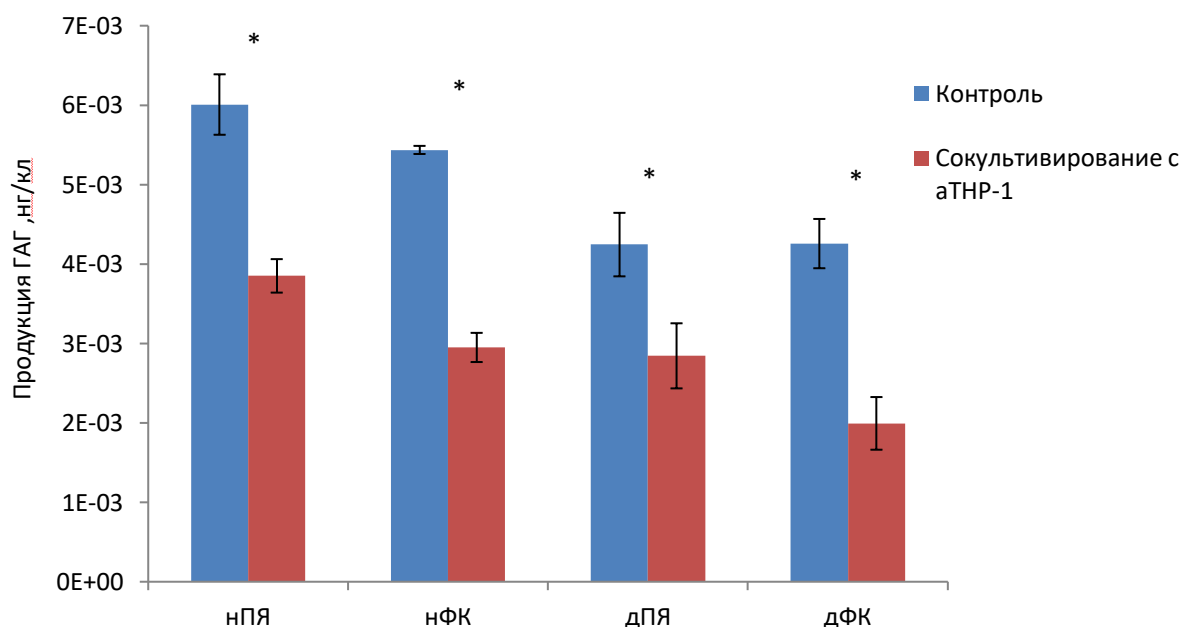


Рисунок 24 – Сравнительный анализ уровня продукции ГАГ в группах неповрежденных и дегенерированных клеток МПД при сокультивировании с активированными клетками ТНР-1 (а ТНР-1) и в контроле. * – $p < 0,05$.

Известно, что в трехмерных клеточных культурах количество синтезируемых клетками МПД компонентов внеклеточного матрикса аналогично таковым в нативной ткани, в то время как культивирование в монослойной культуре способствует снижению экспрессии и синтеза агреканов, коллагена II типа и увеличению коллагена I типа обоими типами клеток МПД (Lemare F. et al., 1998; Kluba T. et al., 2005; Hegewald A.A. et al., 2011). В данном исследовании мы определяли количественный состав ГАГ в трехмерных культурах клеток неповрежденного и дегенерированного МПД, а также при сокультивировании их с макрофагоподобными клетками линии ТНР-1. Выявлено, что клетки ПЯ неповрежденного МПД синтезируют достоверно больше ГАГ, чем клетки ФК, что соответствует распределению ГАГ между ПЯ и ФК в нативном МПД (Roughley P.J. et al., 2006). При дегенерации МПД синтез ГАГ снижался обоими типами клеток, при этом значимых различий в уровне продукции ГАГ между ними уже не наблюдается. Такие изменения, когда во всех частях МПД содержание ГАГ снижается и становится одинаковым, указывают на уменьшение содержания кислорода и нарушение поступления питательных веществ в диск и характерны для дегенеративного процесса в МПД (Русова Т.В. и соавт., 2006). В 1,4 раза отмечено снижение уровня продукции ГАГ клетками дегенерированного ПЯ по сравнению с клетками такового неповрежденного. Являясь основным скаффолдом межклеточного матрикса в комплексе с гиалуроновой кислотой, ГАГ обеспечивают высокое онкотическое давление в ПЯ. При дегенерации МПД происходит фрагментация протеогликанов с утратой цепей ГАГ (Дедух Н.В., 2012; Байков Е.С., 2014). Уменьшение их содержания в ПЯ приводит к снижению гидратации с нарушением механической функции.

Также установлено, что в группах сокультивирования клеток МПД с активированными ТНР-1 клетками наблюдается статистически значимое повсеместное снижение продукции ГАГ по сравнению с соответствующими им группами контроля. Выявленное снижение уровня продукции ГАГ клетками МПД под воздействием провоспалительных цитокинов может вносить значительный вклад в изменение баланса синтеза и распада межклеточного матрикса и

способствовать прогрессированию макроскопически наблюдаемых признаков дегенерации. Считается, что провоспалительные цитокины ФНО- α и ИЛ-1 β опосредованно влияют на дезорганизацию матрикса МПД путем индуцирования экспрессии катаболических ферментов ADAMTS -4, -5, ММП -1, -2, -3, -4, -13 и -14, а также одновременного снижения экспрессии агрекана и коллагена II типа (Weiler C. et al., 2002; Seguin C.A. et al. 2005; Le Maitre C.L. et al. 2007; Pockert A.J. et al., 2009). Хотя многие исследования указывают на доминантную роль ФНО- α в дегенерации МПД (Bachmeier B.E. et al. 2007, Ohba Y. et al., 2009; Purmessur D. et al., 2013; Walter B.A. et al., 2015), ряд авторов полагают, что ключевая роль в дегенерации межклеточного матрикса и последующих дегенеративных изменениях диска принадлежит ИЛ-1 β (Le Maitre C.L. et al., 2005, 2007; Hoyland J.A. et al., 2008). Интерес представляет наблюдение двухфазной, дозозависимой экспрессии агрекана, при которой стимуляция низкими концентрациями ИЛ-1 β (менее 100 пг/мл) увеличивала транскрипцию, тогда как высокая доза более 1 нг/мл уменьшала транскрипцию мРНК агрекана (Phillips K.L. et al., 2015). Данное наблюдение показывает возможность положительного эффекта, опосредованного ИЛ-1 β , направленного на обогащение межклеточного матрикса протеогликанами в интактном МПД, что подтверждают биологическую роль ИЛ-1 β в здоровом МПД и раскрывают возможные механизмы дисрегуляции синтеза межклеточного матрикса при воспалении.

3.2.4. Иммуноцитохимическое исследование клеток межпозвонкового диска под воздействием провоспалительных цитокинов

В данном исследовании мы использовали трехмерные культуры клеток МПД в виде альгинатных микросфер, что по данным морфологического анализа в большей степени соответствует морфологии клеток в нативном МПД. Клетки внутри альгинатной микросферы располагаются так же, как и *in vivo*, находясь по отдельности или образуя изогенные группы (Рисунок 25).

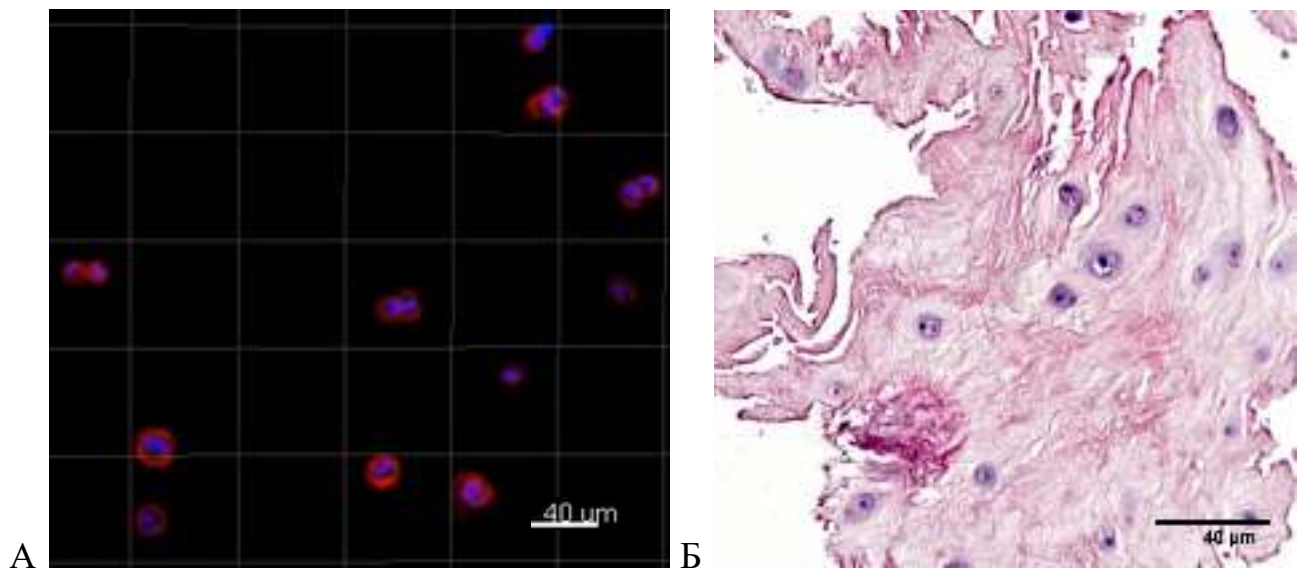


Рисунок 25 – Визуализация клеток дегенерированного пульпозного ядра в альгинатной микросфере и ткани МПД: А – Изображение распределения клеток пульпозного ядра в альгинатной микросфере, полученное с использованием лазерной сканирующей микроскопии, окраска на F-актин (Alexa Fluor® 633 phalloidin – красный) и ядра (DAPI – синий); Б – микрофотография гистологического исследования области пульпозного ядра, окраска гематоксилином и эозином

При сравнении неповрежденных и дегенерированных групп ФК выявлены морфологические отличия: объемы клетки и цитоплазмы были статистически значимо больше в группе клеток неповрежденных ФК ($1276,5 \pm 274,2 \text{ мкм}^3$; $1009,1 \pm 247,1 \text{ мкм}^3$) по сравнению с группой клеток дегенерированного ФК ($1073,2 \pm 367 \text{ мкм}^3$; $817,8 \pm 325,3 \text{ мкм}^3$ соответственно, $p = 0,05$). $R_{n/c}$ индекс был

значимо ниже в группе клеток дегенерированного ФК по сравнению с неповрежденным ($0,27 \pm 0,05$ и $0,35 \pm 0,13$, $p < 0,05$). Количество клеток с пальцевидными выпячиваниями было значимо выше в группах клеток дегенерированного ФК по сравнению с неповрежденным (7/12, 58 %; 1/14, 7,7 % соответственно, $p_{\chi^2} < 0,05$). Процентное отношение клеток с участками отпочковывания цитоплазмы значимо не отличалось (4/14, 29 %; 4/12, 33 % соответственно, $p_{\chi^2} = 0,8$). В группе клеток неповрежденного ФК определялись в основном единичные клетки, но присутствовали и конгломераты. При этом клетки конгломератов имели значительно более высокий K_s по сравнению с единичными клетками ($0,42 \pm 0,08$ и $0,27 \pm 0,04$ соответственно, $p < 0,005$), наиболее вероятно за счет снижения объема цитоплазмы ($819,84 \pm 244,5$ и $1009,1 \pm 247,1$ $\mu\text{м}^3$ соответственно; $p = 0,07$). В клетках конгломератов наблюдалось значительно чаще наличие пальцевидных выпячиваний (5/10, 50 %; 1/13, 8 % соответственно, $p_{\chi^2} < 0,05$), а количество участков отпочковывания цитоплазмы, окруженных актиновым цитоскелетом, значимо не отличалось (6/10, 60%; 4/14, 29 % соответственно, $p_{\chi^2} = 0,1$) (Рисунок 26).

$R_{n/c}$ индекс в группах дегенерированных и неповрежденных ПЯ не отличался ($0,31 \pm 0,05$ и $0,31 \pm 0,06$ соответственно, $p = 0,4$), при этом клетки дегенерированного ПЯ были крупнее клеток неповрежденного ПЯ ($1537,9 \pm 78,2$ и $1440 \pm 316,8$ $\mu\text{м}^3$ соответственно, $p < 0,05$). Выявлено отсутствие значимых различий в количестве клеток с пальцевидными выпячиваниями в группах дегенерированного и неповрежденного ПЯ (2/6, 33 %; 1/12, 8% соответственно, $p_{\chi^2} = 0,2$) при этом процентное отношение клеток с участками отпочковывания цитоплазмы было больше в группе дегенерированного ПЯ (0/12, 0 %; 3/6 50 % соответственно, $p_{\chi^2} < 0,05$).

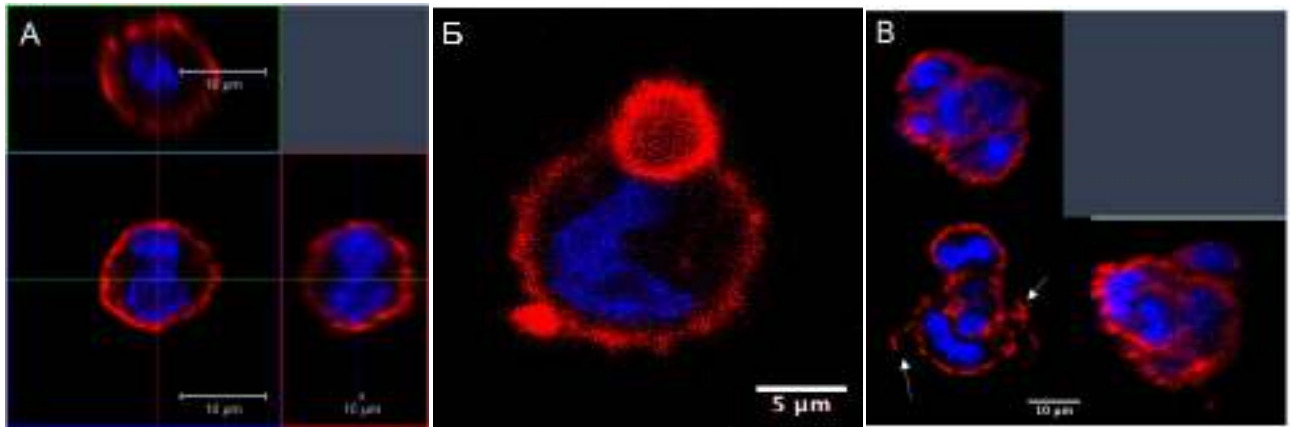


Рисунок 26 – Морфологические особенности неповрежденных клеток ФК в трехмерной культуре: А. Ортогональная проекция единичной клетки ФК. Б. Конфокальный срез демонстрирует два отпочковывающихся участка клетки ФК. В. Конгломерат клеток ФК. Определяются участки с пальцевидными выпячиваниями (стрелки)

При сокультивировании клеток неповрежденного ФК с активированными ТНР-1 клетками выявлено статистически значимое увеличение $R_{n/c}$ индекса по сравнению с контролем ($0,48 \pm 0,26$ и $0,27 \pm 0,05$ соответственно, $p < 0,05$). При этом в группе клеток дегенерированного ФК $R_{n/c}$ индекс статистически не изменялся при сокультивировании с активированными ТНР-1 клетками по сравнению с контролем ($0,35 \pm 0,13$ и $0,38 \pm 0,12$ соответственно, $p = 0,3$), оставаясь значимо выше по сравнению с неповрежденными ФК. Коэффициент сферичности ядра был значимо выше в группе клеток неповрежденного ФК по сравнению с группой сокультивирования их с активированными ТНР-1 клетками ($0,59 \pm 0,03$ и $0,48 \pm 0,26$ соответственно, $p < 0,05$). При этом различия в сферичности ядра в группе клеток дегенерированного ФК и в соответствующей ей группе сокультивирования не наблюдалось ($0,62 \pm 0,22$ и $0,63 \pm 0,17$, $p = 0,4$). Выявлено значимое увеличение доли клеток с пальцевидными выпячиваниями в группе сокультивированных клеток ФК по сравнению с контролем ($4/7$, 57 %; $1/14$, 7 % соответственно, $p_{\chi^2} < 0,05$), при этом процентное отношение клеток с участками отпочковывания цитоплазмы в группах значимо не отличалось ($4/14$, 29 %; $2/7$, 29 % соответственно, $p_{\chi^2} = 1$).

При сокультивировании неповрежденных клеток ПЯ с активированными ТНР-1 клетками выявлено увеличение значения $R_{n/c}$ индекса ($0,31 \pm 0,06$ и $0,41 \pm 0,1$ соответственно, $p < 0,05$); при этом наблюдалось как уменьшение размера клеток ($1140 \pm 316,8$ и $697,6 \pm 108$ мм³ соответственно, $p < 0,05$), так и уменьшение объема цитоплазмы ($799,5 \pm 266,1$ и $501,4 \pm 95,2$ мм³ соответственно, $p < 0,05$). При сокультивировании неповрежденных клеток ПЯ с активированными ТНР-1 клетками наблюдали увеличение доли клеток с пальцевидными выпячиваниями ($1/12$, 8 %; $5/8$, 63 % соответственно, $p_{\chi^2} < 0,05$), а процентное отношение клеток с участками отпочковывания цитоплазмы не достигло значимых различий ($0/12$, 0 %; $1/8$, 13 % соответственно, $p_{\chi^2} = 0,2$).

При сокультивировании клеток дегенерированного ПЯ с активированными ТНР-1 клетками также наблюдали увеличение $R_{n/c}$ индекса ($0,31 \pm 0,05$ и $0,4 \pm 0,07$ соответственно, $p < 0,05$). При этом наблюдалось уменьшение размера клеток ($1537,9 \pm 787,2$ и $842,8 \pm 247,5$ мм³ соответственно, $p < 0,05$) и уменьшение объема цитоплазмы ($1188,7 \pm 635,4$ и $611,1 \pm 196,9$ мм³ соответственно, $p < 0,05$). При сокультивировании клеток дегенерированного ПЯ доля клеток с пальцевидными выпячиваниями значимо не изменялась ($2/6$, 33 %; $2/11$, 18 % соответственно, $p_{\chi^2} = 0,5$), а различия в процентном отношении клеток с участками отпочковывания цитоплазмы были статистически значимыми ($3/6$, 50 %; $0/11$, 0 % соответственно, $p_{\chi^2} < 0,05$).

S. Pritchard и соавт. (2002) показали актин-опосредованное уменьшение размеров клеток МПД при осмотическом стрессе. Данный стресс обусловлен компрессионными механическими нагрузками в МПД которые приводят к гиперосмолярности межклеточного матрикса. Проведенное нами исследование выявило значимое уменьшение объемных показателей клеток ФК и ПЯ под действием провоспалительных цитокинов, что схоже с изменениями под гиперосмолярным стрессовым влиянием (Pritchard S. et al., 2002). Размер эффекта – увеличение ядерно-цитоплазматического отношения был выше в группах неповрежденных клеток ФК по сравнению с неповрежденными ПЯ, что так же согласуется с результатами S. Pritchard и соавт. (2002), который выявил

аналогичные различия в изменении размеров неповрежденных клеток ПЯ и ФК как реакцию на гиперосмолярный стресс. Более того, увеличение $R_{n/c}$ индекса наблюдали при сравнении неповрежденных и дегенерированных клеток ФК, но не наблюдали при сравнении аналогичных групп клеток ПЯ. Считается, что важной особенностью клеток ПЯ является обилие актиновых микрофиламентов (Guilak F et al., 1999), что обуславливает большую толерантность клеток ПЯ к изменениям осмолярности, нежели клеток ФК (Pritchard S. et al., 2002). В свою очередь, при дегенерации клетки МПД могут исчерпать резерв адаптации на стрессовые воздействия, что может обуславливать отсутствие значимых различий в изменении ядерно-цитоплазматических отношений в группе дегенерированных клеток ФК при сокультивировании с aTNP клетками (Hunter C.J. et al., 2003). Актиновые микрофиламенты играют основную роль в обеспечении механической стабильности и поведении клеток МПД при клеточном ответе на различные стрессорные факторы, как механические, осмотические, и вероятно, цитокиновые воздействия.

Наблюдаемые нами в трехмерной культуре выпячивания и отпочковывания цитоплазмы клеток схожи с описанными отпочковываниями клеток нативного МПД собаки (Hunter C.J. et al., 2003). Безъядерные, окруженные актином выпячивания (включения) обильны в хондроцитах недегенерированного МПД, в среднем около 7 на клетку (Hunter C.J. et al., 2003), однако в трехмерных культурах наблюдались несколько меньше в размерах и количестве, чаще 0-1 на клетку. Большинство клеток дегенерированного ПЯ в культуре, как и нативные клетки ПЯ, были сферичные, с небольшим ободком цитоплазмы вокруг ядра и плотной упорядоченной сетью актиновых волокон по периферии. Наблюдаемые нами в культуре клеток МПД выпячивания цитоплазмы и актиновых микрофиламентов также характерны для нативных клеток (Johnson W.E., Roberts S., 2003).

Следует отметить, что несмотря на то, что в данном исследовании клетки наиболее приближены по своим морфологическим формам к нативным клеткам МПД по сравнению с другими моделями для культивирования, они все же не в полной мере реплицируют сложную трехмерную форму клеток ПЯ и ФК *in vivo*,

отличаясь преимущественно отсутствием длинных выпячиваний и отростков клеток в вещество межклеточного матрикса (Pritchard S. et al., 2002; Johnson W.E., Roberts S., 2003). Однако на данный момент такая методика культивирования клеток МПД считается адекватной и широко используемой для решения экспериментальных задач схожего уровня (Lemare F. et al.; 1998; Kluba T. et al., 2005; Chou A.I. et al., 2008; Hegewald A.A. et al., 2011).

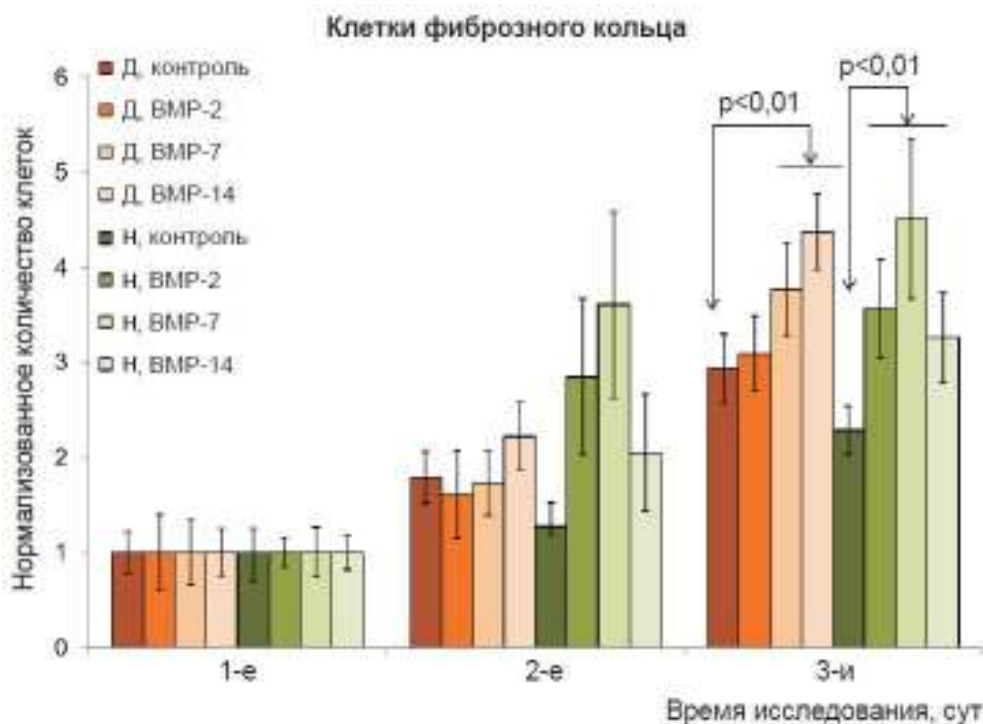
Таким образом, исследование показало, что в кластерах клеток ФК при трехмерном культивировании наблюдаются признаки, характерные для дегенерации МПД человека. Объемные отношения ядра и цитоплазмы являются достаточно консервативными величинами и тесно связаны между собой, при этом на изменение размера ядра оказывает влияние объем окружающей цитоплазмы и доступность мембран, контролируемая микротрубочками и динеином. (Good M.C., 2015). Изменение ядерно-цитоплазматических отношений является важным фактором адаптации клеток МПД и реакции на неблагоприятные воздействия.

3.3. Исследование влияния костных морфогенетических белков-2, -7 и -14 на клетки межпозвонкового диска

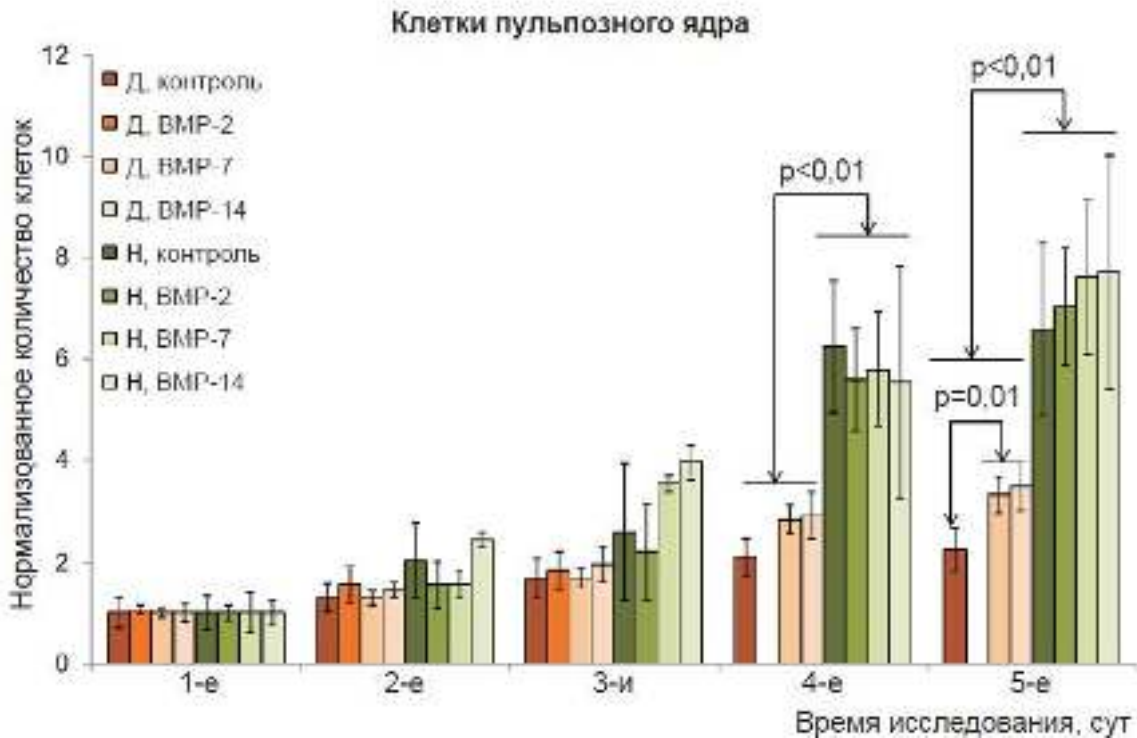
3.3.1. Исследование пролиферативной активности клеток межпозвонкового диска при воздействии костных морфогенетических белков

В настоящем исследовании проведена оценка эффективности влияния КМБ-2, КМБ-7, и КМБ-14 на динамику пролиферативной активности клеток ПЯ и ФК неповрежденного и дегенерированного МПД.

Для учета разницы в исходном количестве неповрежденных и дегенерированных клеток ФК и ПЯ при сравнении пролиферации клеточных популяций данные нормализованы к изначальной плотности засеивания культур клеток. Увеличение числа клеток ПЯ наблюдали в течение последующих четырех дней эксперимента ($p = 0,01$ до $p = 0,04$), а клеток ФК – в течение 3х дней ($p < 0,01$), а затем клетки достигали непрерывного слоя. В последующие дни эксперимента увеличения экспоненциального роста не отмечалось вследствие контактного ингибирования пролиферации. В связи с этим рост популяции клеток рассчитан с учетом трех дней для культур клеток ФК и пяти дней для клеток ПЯ (Рисунок 27).



А



Б

Рисунок 27 – Сравнение нормализованных значений динамики количества неповрежденных (н) и дегенерированных (д) клеток: А — фиброзного кольца; Б — пульпозного ядра; значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение

Модель роста клеток рассчитывали исходя из нормализованного числа клеток, что позволило определить коэффициенты роста для клеточных популяций. Выявлено отсутствие статистически значимых различий коэффициентов пролиферации в группах дегенерированных и неповрежденных клеток ФК ($p > 0.9$). В то же время пролиферативная активность дегенерированных клеток ПЯ была значимо снижена в сравнении с неповрежденными клетками ПЯ ($p < 0.05$). Коэффициенты роста культур неповрежденных и дегенерированных клеток МПД представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Коэффициенты пролиферации дегенерированных и неповрежденных клеток пульпозного ядра (ПЯ) и фиброзного кольца (ФК) под воздействием костных морфогенетических протеинов (КМБ)

Среда культиви- рования	Дегенерированные клетки		Неповрежденные клетки	
	ФК	ПЯ	ФК	ПЯ
<i>Коэффициент пролиферации (r)</i>				
Контрольная	0,36	0,17	0,21	0,39
КМБ-2	0,36	0,2	0,42	0,36
КМБ-7	0,39	0,22	0,51	0,4
КМБ-14	0,46	0,24	0,36	0,42
<i>Коэффициент Пирсона (R²)</i>				
Контрольная	0,93	0,91	0,68	0,84
КМБ-2	0,91	0,87	0,76	0,86
КМБ-7	0,91	0,87	0,75	0,89
КМБ-14	0,93	0,92	0,8	0,92

При общем сравнении роста клеток в культурах по критерию ANOVA выявлено отсутствие значимого эффекта всех типов КМБ на пролиферацию неповрежденных клеток ($p = 0,17$), в то же время обнаружено их влияние на дегенерированные клетки МПД ($p < 0,01$) (Рисунок 27). По сравнению с контрольной группой отмечается увеличение роста неповрежденных клеток ФК под влиянием всех КМБ ($p < 0,01$), а также дегенерированных клеток ФК под влиянием КМБ-14 ($p < 0,01$). Выявлено отсутствие влияния всех КМБ на рост неповрежденных клеток ПЯ ($p = 0,51$), в то же время в группе дегенерированных клеток ПЯ отмечено увеличение количества клеток под действием КМБ-7 и КМБ-14 ($p = 0,01$).

Известно, что КМБ-14 экспрессируется как в нормальных, так и

дегенерированных клетках МПД, особенно в клетках ПЯ, однако не прослеживается какой-либо корреляции между наличием или отсутствием дегенерации МПД и уровнем экспрессии КМБ-14 (Le Maitre C.L. et al., 2009; Li Y.F. et al., 2015). В исследовании, проведенном на нативных образцах тканей ФК Н.Е. Gruber с соавт. (2014), также не отмечено каких-либо существенных различий в уровнях экспрессии КМБ-14 между дегенерированными и условно здоровыми МПД, но было отмечено значительное повышение (более чем в 2 раза) его экспрессии в МПД с грыжевыми выпячиваниями по сравнению с МПД без них. В то же время, при проведении исследования на трехмерной культуре клеток ФК установлено значительное снижение экспрессии КМБ-14 под воздействием провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-1 β , которые принимают участие в дегенерации и грыжеобразовании МПД (Gruber Н.Е. et al., 2014). В эксперименте на бычьих клетках МПД воздействие КМБ-14 индуцировало рост числа клеток как ПЯ, так и ФК (Chujo T. et al., 2006). Нами установлено, что КМБ-14 усиливал пролиферацию дегенерированных и неповрежденных клеток ФК, а также дегенерированных клеток ПЯ.

В связи с дефицитом питательных веществ в МПД подходы к регенеративной терапии должны учитывать численность клеток и спрос на питательные вещества. В данном исследовании мы показали, что КМБ-2 и -7 в целом не оказали выраженного влияния на пролиферацию неповрежденных клеток ПЯ, незначительно увеличивая пролиферацию дегенерированных клеток ПЯ. В то же время культивирование дегенерированных клеток ПЯ в присутствии КМБ-7 и -14 не позволило достичь показателей пролиферативной активности недегенерированных клеток, а пролиферативная активность неповрежденных и дегенерированных клеток ФК значимо не отличалась, что является позитивным в аспекте дефицита питательных веществ в условиях сниженного нутритивного транспорта в диске. Отмеченные различия в скорости роста клеток ПЯ и ФК могут свидетельствовать о различной степени толерантности клеточных популяций МПД к дегенерации, либо о преимущественной роли клеток ПЯ в клеточном звене дегенерации МПД.

3.3.2. Оценка нутритивного статуса и метаболизма клеток межпозвонкового диска при воздействии костных морфогенетических белков

В настоящем исследовании проведена оценка влияния КМБ-2, КМБ-7, и КМБ-14 на уровни потребления глюкозы и продукции лактата клетками ПЯ и ФК неповрежденного и дегенерированного МПД.

Исследование потребления глюкозы клетками ПЯ и ФК неповрежденного и дегенерированного МПД при воздействии КМБ

При определении уровня потребления глюкозы клетками ПЯ и ФК неповрежденного и дегенерированного МПД при воздействии КМБ выявлено отсутствие статистически значимых различий между группами неповрежденных и дегенерированных клеток ($p = 0,36$); группами клеток, культивированных под воздействием КМБ-2, КМБ-7 или КМБ-14 ($p=0,43$), а также между группами клеток ПЯ и ФК ($p=0,5$) (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнительный анализ уровня потребления глюкозы в группах неповрежденных и дегенерированных клеток МПД при воздействии костных морфогенетических белков; значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение (нмоль/(кл*ч))

Среда культивирования	Дегенерированные клетки		Неповрежденные клетки	
	ФК	ПЯ	ФК	ПЯ
Контрольная	$5,67 \pm 4,04 * 10^{-4}$	$6,66 \pm 2,39 * 10^{-4}$	$4,93 \pm 2,26 * 10^{-4}$	$6,04 \pm 3,31 * 10^{-4}$
КМБ-2	$3,12 \pm 0,87 * 10^{-4}$	$5,38 \pm 4,28 * 10^{-4}$	$4,66 \pm 2,41 * 10^{-4}$	$9,04 \pm 7,69 * 10^{-4}$
КМБ-7	$3,23 \pm 2,57 * 10^{-4}$	$3,67 \pm 0,52 * 10^{-4}$	$4,75 \pm 1,68 * 10^{-4}$	$6,35 \pm 5,02 * 10^{-4}$
КМБ-14	$5,87 \pm 1,75 * 10^{-4}$	$4,42 \pm 2,2 * 10^{-4}$	$4,43 \pm 1,87 * 10^{-4}$	$6,93 \pm 4,9 * 10^{-4}$

Таким образом, нами установлено отсутствие значимого влияния КМБ на уровень потребления глюкозы. Можно предположить, что при воздействии КМБ на клетки МПД последние не будут подвергаться голоданию вследствие дефицита глюкозы, который мог бы возникнуть при увеличении ее потребления в замкнутой системе аваскулярного МПД.

Исследование продукции лактата клетками ПЯ и ФК неповрежденного и дегенерированного МПД при воздействии КМБ

При проведении сравнительного анализа продукции лактата клетками ПЯ и ФК неповрежденного и дегенерированного МПД при воздействии КМБ выявлено отсутствие статистически значимых различий между группами в зависимости от типа КМБ ($p=0,15$), типа клеток МПД ($p=0,29$), но было значимо выше в группах неповрежденных клеток МПД по сравнению с группами дегенерированных клеток ($p = 0,03$) (Рисунок 28).

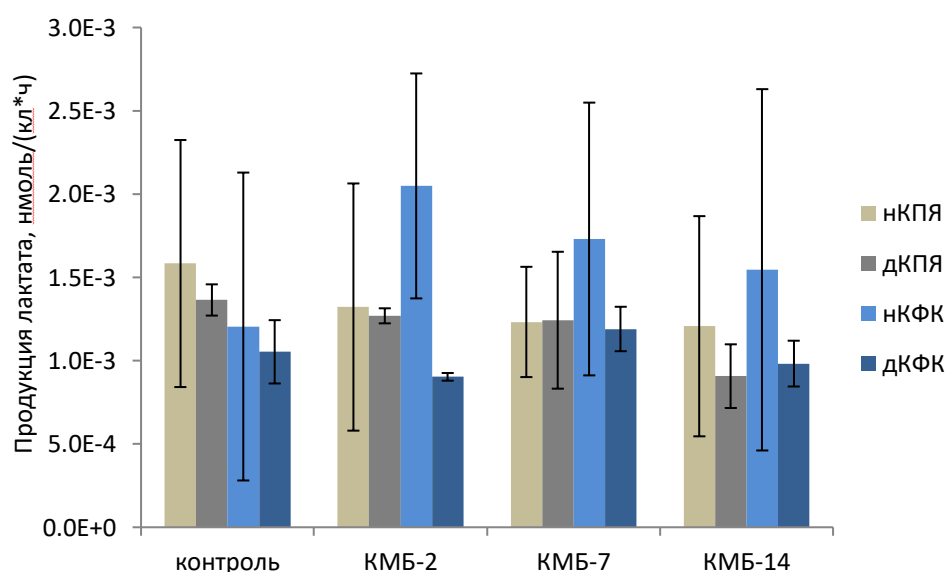


Рисунок 28 – Сравнительный анализ продукции лактата в группах неповрежденных (н) и дегенерированных (д) клеток ПЯ (КПЯ) и ФК (КФК) при воздействии костных морфогенетических белков-2, -7 и -14

При попарном сравнении выявлено, что в группе дегенерированных клеток ПЯ, культивируемых с КМБ-2, определяется меньше уровень лактата по сравнению с соответствующей группой контроля ($p < 0,05$). Также обнаружено, что

в группе дегенерированных клеток ФК, культивированных с КМБ-14, определяется меньше количества лактата по сравнению с соответствующей группой контроля ($p < 0,05$). Среди дегенерированных клеток в группах клеток ПЯ определялось достоверно меньше количества лактата, чем в группах ФК ($p < 0,05$). Таким образом, эксперимент с определением концентрации лактата показал, что на его уровень оказывает влияние статус дегенерации клеток, а не воздействие исследуемых КМБ.

Эксперименты *in vitro* показывают, что хронический недостаток глюкозы приводит к гибели клеток МПД, а при хроническом недостатке кислорода происходит снижение клеточной активности в целом, но при этом клетки МПД остаются живыми на протяжении многих дней (Ishihara H., Urban J.P., 1999; Horner H.A., Urban J.P., 2001; Bibby S.R.S., Urban J.P.G., 2004). В то же время, в исследовании S.E. Cisewski и соавт. (2018) показано, что уровень потребления кислорода дегенерированными клетками МПД был в 3-5 раз выше, чем неповрежденными клетками при одинаковых условиях их культивирования (Cisewski S.E. et al., 2018), указывая на вероятное продуцирование клетками АТФ через аэробное дыхание в дополнение к гликолизу (Wang C. et al., 2013). Однако это исследование имеет важное ограничение: известно, клетки МПД изменяют свой фенотип в процессе их культивирования и многочисленных пассажей (Tang X. et al., 2014), а культивирование их в монослое индуцирует окислительный метаболизм в хондроцитах (Heywood H.K., Lee D.A., 2008).

Еще одним ограничением в трансляции выводов является то, что, как и большинство исследований в данной области, культивирование клеток МПД проводилось при высоких концентрациях кислорода и глюкозы, что отличается от *in vivo* условий клеток МПД. Мы посчитали нецелесообразным создавать ограниченные уровни глюкозы и кислорода без использования биореакторной системы, способной поддерживать эти условия без колебаний в течение всего эксперимента.

Исследование метаболической активности клеток ПЯ и ФК неповрежденного и дегенерированного МПД при воздействии КМБ

Для оценки активности метаболических процессов в клетках применяли тест-систему с индикатором Alamar blue, которая обладает высокой чувствительностью и не приводит к гибели исследуемых клеток.

При проведении сравнительного анализа уровня метаболической активности в культурах клеток установлено отсутствие статистически значимых различий в зависимости от типа КМБ ($p = 0,44$). Уровень метаболической активности не имел существенных отличий у дегенерированных клеток ФК по сравнению с неповрежденными клетками ФК ($p = 0,19$), а у дегенерированных клеток ПЯ был значительно выше по сравнению с неповрежденными ($p < 0,001$). Выявлено, что во всех группах клеток ПЯ восстановление Alamar blue происходило медленнее, чем в группах клеток ФК ($p < 0,004$) (Рисунок 29).

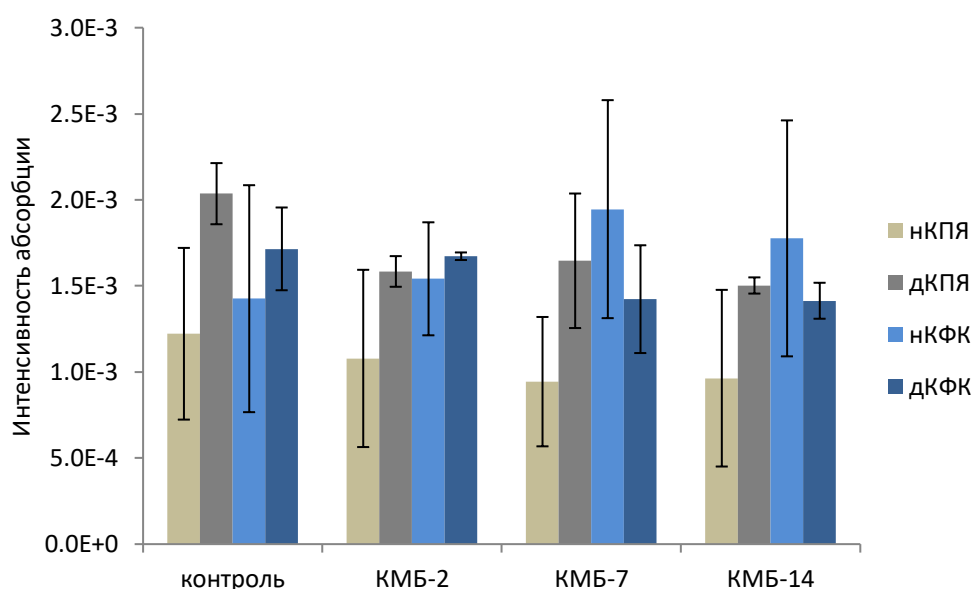


Рисунок 29 – Сравнительный анализ интенсивности абсорбции индикатора Alamar blue в группах неповрежденных (н) и дегенерированных (д) клеток ПЯ (КПЯ) и ФК (КФК) при воздействии костных морфогенетических белков

Таким образом, нами установлено отсутствие значимого влияния КМБ на уровень метаболической активности клеток МПД. Также выявлено, что в группах клеток ПЯ метаболическая активность была значимо ниже по сравнению с группами клеток ФК. Среди всех групп клеток ПЯ уровень метаболической активности оказался выше в группе дегенерированных клеток по сравнению с

неповрежденными. Существующие вследствие аваскулярности диска градиенты концентрации кислорода и глюкозы могут изменять локальный метаболизм клеток нативного МПД. Градиент концентрации в разных областях МПД оказывает сильное влияние на скорость метаболизма и выживаемость клеток и, следовательно, на развитие дегенерации диска. В математической модели диска, предложенной А. Shirazi-Adl и соавт. (2010) наиболее удаленной областью от кровеносных капилляров является центральная часть ПЯ на плоскости средней высоты диска: здесь отмечаются самые низкие концентрациями кислорода и глюкозы и максимальный уровень концентрации лактата. В этой зоне клетки находятся на расстоянии до 7-8 мм от ближайшего кровеносного сосуда (Urban J.P et al., 2004). Таким образом, центральная часть ПЯ, вероятно, в первую очередь вовлечена в процесс дегенерации МПД из-за наиболее экстремальных условий жизнедеятельности клеток.

3.3.3. Исследование синтетической активности клеток межпозвонкового диска при воздействии костных морфогенетических белков

Обеспечение функций МПД, таких как способность переносить механические нагрузки и высокое осмотическое давление, тесно связано с содержанием протеогликанов. Количество сульфатированных ГАГ, наиболее часто встречающихся в составе протеогликанов МПД, определяли в клеточном экспланте с использованием тест-системы, основанной на реакции с 1,9-диметил-метиленовым голубым.

Сравнительная оценка уровней продукции ГАГ всех исследуемых групп неповрежденных и дегенерированных клеток МПД показала, что дегенерированные клетки МПД продуцируют в несколько раз меньше ГАГ, чем неповрежденные ($p < 0,001$). Это касается как клеток ПЯ ($p < 0,001$), так и клеток ФК ($p < 0,001$) (Рисунок 30).

Выявлено статически значимое увеличение количества ГАГ в результате культивирования неповрежденных клеток ПЯ в присутствии КМБ-7 ($p = 0,05$) и

КМБ-14 по сравнению с контролем ($p = 0,05$) (Рисунок 30). При изучении влияния КМБ-2, -7 и -14 на уровень продукции ГАГ клетками неповрежденного ФК установлено, что во всех исследуемых группах имелась тенденция к повышению уровня продукции ГАГ ($p = 0,087$), при этом выраженный позитивный эффект по сравнению с контролем оказал КМБ-7 ($p = 0,006$).

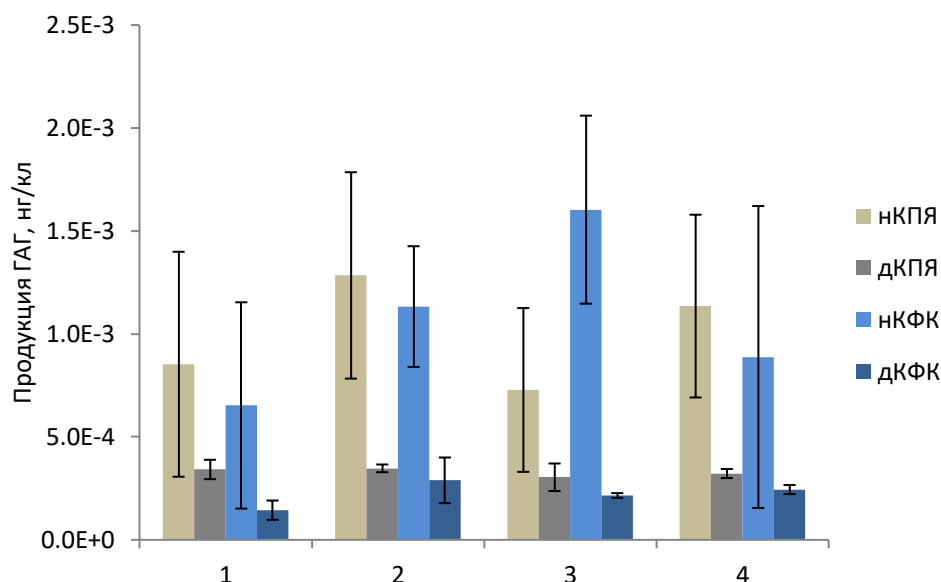


Рисунок 30 – Сравнительный анализ синтеза ГАГ в группах неповрежденных (н) и дегенерированных (д) клеток ПЯ (КПЯ) и ФК (КФК) при воздействии костных морфогенетических белков

Выявлено отсутствие статистически значимого влияния КМБ-2, -7 или -14 на уровень продукции ГАГ клетками дегенерированного ПЯ по сравнению с контрольной группой ($p = 0,2$) (Рисунок 30). При анализе уровня продукции ГАГ клетками дегенерированного ФК под влиянием КМБ-2, -7 или -14 также выявлено отсутствие значимого различия по сравнению с контрольной группой ($p = 0,5$).

Таким образом, в результате оценки продукции ГАГ клетками ПЯ и ФК *in vitro* в средах с добавлением КМБ-2, КМБ-7 и КМБ-14 по сравнению с контролем показали позитивный эффект КМБ-7 в отношении клеток неповрежденных ПЯ и ФК и КМБ-14 в отношении клеток неповрежденного ПЯ. Отсутствие значимого эффекта исследуемых КМБ на дегенерированные клетки МПД может быть связано с непродолжительным периодом культивирования (5 дней) либо недостаточной для

воспроизведения эффекта концентрацией КМБ. В исследовании С.L. Le Maitre с соавт. (2009) трехмерные культуры дегенерированных клеток ПЯ культивировали с КМБ-14 в концентрации 200 нг/мл в течение 2 недель, затем клетки отделяли от альгинатного скаффолда и определяли количество ГАГ в двух полученных образцах отдельно. В образцах, состоящих только из клеточной массы, не было отмечено изменения количества ГАГ под влиянием КМБ-14 по сравнению с контролем, в то время как в образцах альгинатного скаффолда количество ГАГ, выделенного клетками под влиянием КМБ-14 во внеклеточную среду, достигло статистически значимого увеличения. Таким образом, еще одной вероятной причиной отсутствия или наличия эффекта КМБ на продукцию ГАГ может являться особенность методики их определения. Поскольку нами эксперимент проведен на монослойных культурах клеток МПД, то не представлялось возможным определить уровень продукции ГАГ, выделяемых во внеклеточную среду, где они могли бы накапливаться; таким образом, нами определялось количество ГАГ, полученное только из клеточной массы. Как было показано в вышеописанном эксперименте С.L. Le Maitre с соавт. (2009), определение ГАГ в кондиционированной питательной среде также не дало статистически значимых результатов между группами.

КМБ-7, также известный как остеогенный белок-1, используется для активизации процессов остеосинтеза при проведении операции спондилодеза и других ортопедических вмешательств на костной ткани (Lo K.W. et al., 2012). Что касается изучения его влияния на регенерацию МПД, исследования, проведенные на кроликах в условиях *in vitro* и *in vivo*, показали, что КМБ-7 стимулирует продукцию внеклеточного матрикса клетками МПД, в частности протеогликанов (An H.S. et al., 2005; Miyamoto K. et al., 2006; Masuda K. et al., 2003, 2006). Однако в исследовании В.G.M. Van Dijk с соавт (2017), проведенном на модели ПЯ дегенерированного МПД человека при болюсном введении 100 мкг КМБ-7 либо посредством замедленного высвобождения из биоразлагаемых микросфер в течение 28 дней, никакого эффекта КМБ-7 не наблюдалось – ни при оценке экспрессии генов агрекана и коллагена II типа, ни общего количества синтезированных ГАГ клетками ПЯ. В проведенном нами исследовании так же

показано отсутствие влияния КМБ-7, что согласуется с данными литературы. Одним из возможных объяснений наличия лечебного эффекта КМБ-7 на клетки МПД кролика и в то же время отсутствия его на клетки МПД человека авторы приводят разницу в клеточном составе МПД у человека и кролика, в частности наличие нотохордальных клеток у взрослых особей кроликов, которые являются более восприимчивыми к факторам роста (van Dijk B.G.M. et al., 2017). Известно, что у кроликов нотохордальные клетки сохраняются в МПД в течение всей жизни (Sowa G. et al., 2008), а у человека присутствуют только в раннем возрасте и затем полностью исчезают (Hunter C.J. et al., 2004). Эта гипотеза поддерживается наблюдением, что клеточные культуры, изолированные от ПЯ кролика (Masuda K. et al., 2003) и культивированные в течение 2 недель в альгинатных микросферах, оказались в 2,5 раза чувствительнее к воздействию 200 нг/мл КМБ-7, чем культуры клеток ПЯ человека в таких же условиях (Imai Y. et al., 2007). Более того, клеточная плотность в МПД, содержащих нотохордальные клетки, выше, так что оба этих эффекта могут объяснить более сильное влияние КМБ-7 на клетки МПД животных. Как считает B.G.M. Van Dijk с соавт. (2017), успешная терапия КМБ-7 возможна только при тщательном подборе донора с ранней стадией дегенерации МПД и при высоких концентрациях данного фактора роста, что может, в то же время, вызывать нежелательные последствия в виде чрезмерной оссификации МПД, а кроме этого, значительно увеличивать стоимость такой терапии.

3.4.3. Иммуноцитохимическое исследование клеток межпозвонкового диска

При 100%-ной конfluenceции клетки ФК и ПЯ имели схожую веретенообразную форму с продольной ориентацией в одном направлении либо радиальной – к центрам скопления клеток (Рисунок 31). Клетки в культурах, не достигших полной конfluenceции, имели продолговатую или звездчатую форму с 3-4 отростками, реже веретенообразную. Часть клеток ПЯ и реже – клетки ФК образовывали тонкие длинные отростки, которые у клеток ПЯ были значительно длиннее, чем у клеток ФК, достигая 250 мкм в длину.

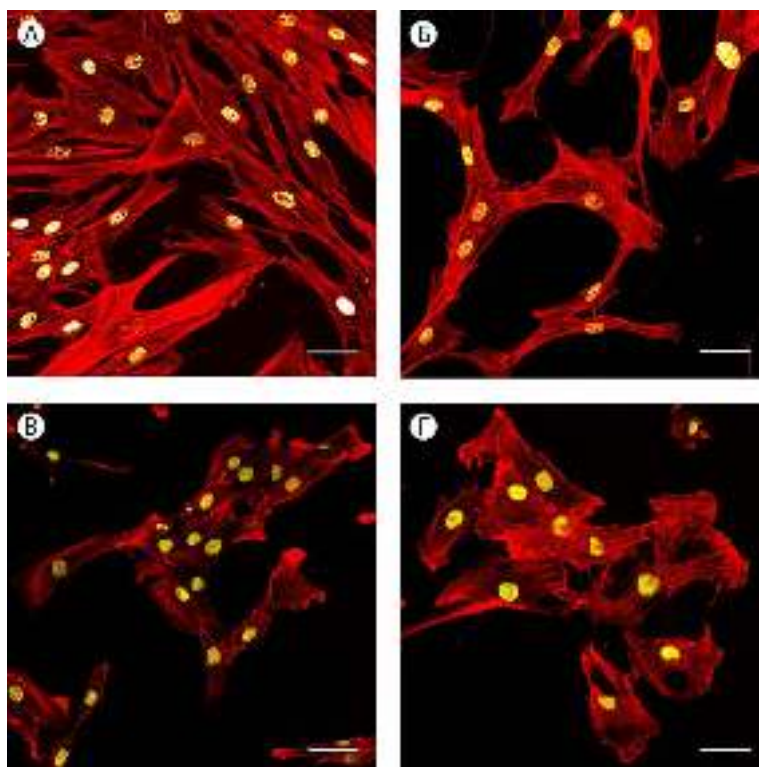


Рисунок 31 – Иммуноцитохимическая окраска клеток ФК и ПЯ неповрежденного (А и Б соответственно) и дегенерированного (В и Г соответственно) МПД, фиксированных на 4-й день культивирования: окраска на F-актин (Alexa Fluor 633 phalloidin, отмечено красным цветом) и на ядерную ДНК (DAPI, отмечено желтым цветом); изображения сделаны с использованием лазерной сканирующей микроскопии (бар – 50 мкм)

Актиновый цитоскелет хорошо выражен, микрофиламенты располагались равномерно по всей площади клетки, сопровождая выпячивания. Ближе к краю клеток актиновые филаменты образовывали окрашенные гиперинтенсивные скопления в виде глыбок, свидетельствуя об активной сборке актина при формировании выпячиваний. Ядра клеток ровные овальные, размером от 15 до 30 мкм в диаметре.

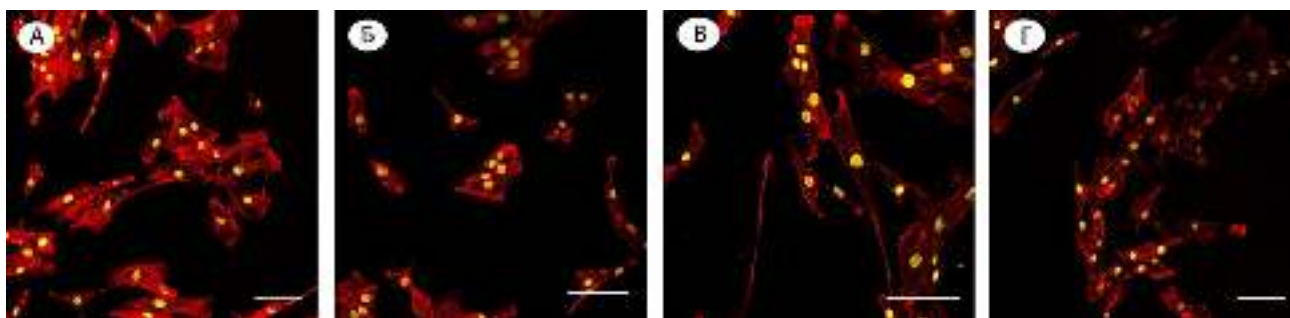


Рисунок 32 – Иммуноцитохимическая окраска клеток дегенерированного ПЯ: А – культивированных в контрольной среде без добавления КМБ; Б – с добавлением КМБ-2; В – с добавлением КМБ-7; Г – с добавлением КМБ-14. Клетки фиксированы на 4-й день культивирования: окраска на F-актин (Alexa Fluor 633 phalloidin, отмечено красным цветом) и на ядерную ДНК (DAPI, отмечено желтым цветом); изображения сделаны с использованием лазерной сканирующей микроскопии (бар – 50 мкм)

Таким образом, при проведении иммуноцитохимического исследования с окраской на актиновый цитоскелет КПЯ и КФК как неповрежденного, так и дегенерированного МПД имели схожие морфологические формы (Рисунок 31) и не проявляли очевидных различий в присутствии КМБ (Рисунок 32).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дегенеративно-дистрофические заболевания МПД продолжают оставаться актуальной проблемой современной медицины. Наиболее частым клиническим проявлением дегенеративных процессов МПД является боль в спине, которая зачастую сопряжена с утратой трудоспособности. Причины развития дегенеративных процессов МПД до конца не изучены, но можно с уверенностью сказать, что они начинаются в первую очередь в клетках МПД и, прогрессируя, проявляют себя в виде структурных и функциональных нарушений диска. В настоящее время консервативные методы лечения дегенеративных процессов МПД направлены лишь на устранение болевого синдрома, однако только купирование боли без восстановления биомеханики и структуры МПД приводит к прогрессированию дегенерации. Распространенным методом хирургического лечения дегенеративных процессов МПД становится артропластика (замена искусственным диском), направленная на восстановление подвижности позвоночника. Однако такого рода имплантаты, помимо высокой стоимости, имеют ряд других недостатков, что ограничивает их широкое применение: они не способны полностью имитировать механическую функцию нативного МПД, а также подвержены достаточно быстрому износу (E.N. Hanley et al., 2010).

Растущий в последнее десятилетие интерес к развитию клеточной терапии дегенеративного поражения МПД привел к более глубокому пониманию биологии МПД в целом. Особенно информативными представляются результаты, полученные в исследованиях *in vitro* и на животных. Тем не менее, существует ряд проблем, которые необходимо преодолеть прежде, чем биологические методы коррекции дегенерации МПД, в том числе и имплантация клеток, могут быть использованы в повседневной клинической практике. Одна из задач состоит в том, чтобы улучшить характеристику фенотипа различных популяций клеток МПД, а затем определить, как они взаимодействуют в нормальных условиях, а также в условиях воспаления и дефицита питательных веществ, присущих для дегенерированных дисков. Кроме того, в связи с аваскулярностью МПД и

дефицитом питательных веществ подходы к регенеративной терапии должны учитывать численность клеток и их спрос на питательные вещества. Вовлечение локальных воспалительных механизмов при дегенерации МПД дополнительно осложняет условия существования для клеток, что обуславливает актуальность изучения изменения потребности и транспорта питательных веществ, а также выживаемости клеток в данных условиях.

В данной работе определены особенности распределения коэффициента диффузионного транспорта в различных отделах МПД – ПЯ, переднем и заднем отделах ФК, а также в замыкательной пластинке, и изучена связь между диффузионным транспортом и микроструктурной организацией внеклеточного матрикса МПД человека. Корреляционный анализ клеточной плотности и КД в различных отделах МПД выявил значимую обратную ранговую корреляцию. Значительная доля в данной связи принадлежит ПЯ, обладающему низкой клеточной плотностью при наиболее высоком показателе КД. При оценке задних отделов ФК наблюдалась прямая корреляция между значением КД и клеточной плотностью, а также в замыкательной пластинке на уровне задних отделов ФК. В целом сравнительный анализ показал, что исследованные отделы МПД обладают различными показателями клеточной плотности и диффузионного транспорта. Наблюдающаяся корреляция умеренной силы позволяет заключить, что клеточная плотность отражает различный по степени вклад в измеряемый КД в зависимости от отделов МПД. Кроме того, применение метода ДВ МРТ с определением КД позволило объективно охарактеризовать диффузию в МПД на тканевом уровне, которая коррелировала с ранними морфологическими и ультраструктурными признаками дегенерации МПД. Развивающиеся морфологические изменения в МПД сопровождаются изменением состава межклеточного матрикса, в частности, спектром синтезируемого коллагена. В тканях диска с КД ПЯ менее $15 \cdot 10^{-4}$ мм²/с помимо агрекана, коллагенов I и II типов, методами лазерной конфокальной и трансмиссионной микроскопии были выявлены коллагены X и XI типов, а клетки ПЯ имели признаки дистрофии. В МПД с высоким показателем диффузии (среднее КД ПЯ $1784 \pm 193 \cdot 10^{-6}$ мм²/с) трехмерная структура компонентов межклеточного

матрикса имела в основном диффузную или упорядоченную волокнистую форму, в данных образцах не выявлен коллаген X и XI типов, что соответствует антигенному спектру матрикса нормального МПД.

В качестве воспроизводства комплексного цитокинового влияния на клетки МПД была использована модель сокультивирования клеток МПД с активированными макрофагоподобными клетками линии ТНР-1. При исследовании уровней секреции ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ИЛ-12p70 выявлены значимые различия в уровне спонтанной секреции цитокинов неповрежденными и дегенерированными клетками МПД, а также показано значимое увеличение уровня ИЛ-1 β и ИЛ-8 в группах сокультивирования, что подтверждает состоятельность данной модели.

При анализе продукции лактата клетками неповрежденного МПД выявлено, что клетки ФК выделяют достоверно больше лактата, чем клетки ПЯ ($p < 0,05$), а дегенерированном МПД уровень продукции лактата был снижен и оказался одинаковым для обоих типов клеток ($p = 0.83$). Впервые определены уровни продукции лактата клетками неповрежденных и дегенерированных клеток ПЯ и ФК под влиянием провоспалительных цитокинов в эксперименте. Выявлено статистически значимое увеличение уровня продукции лактата в группе сокультивирования как неповрежденных, так и дегенерированных клеток ПЯ и ФК с активированными ТНР-1 клетками по сравнению с соответствующими им монокультурами. Схожих исследований по оценке нутритивного статуса клеток МПД под влиянием провоспалительных цитокинов нами не найдено, однако наиболее близкими являются исследования на хондритах суставных хрящей человека (Shikhman A.R. et al., 2001; Sopasakis V.R. et al., 2018), которые также подтвердили увеличение нутритивной потребности клеток под влиянием ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6. Таким образом, вместе с данными литературы результаты исследования, проведенного нами на культурах клеток МПД человека, свидетельствуют о потенциале значительного увеличения метаболизма клеток ПЯ и ФК путем активации гликолиза под действием провоспалительных цитокинов в условиях достаточной доступности глюкозы.

Тест с 1,9-диметил-метиленовым синим на определение сульфатированных ГАГ показал статистически значимое снижение уровня продукции ГАГ дегенерированными клетками ПЯ в 1,4 раза и ФК в 1,3 раза по сравнению с таковыми неповрежденными, а также повсеместное снижение продукции ГАГ в группах сокультивирования клеток МПД и активированных ТНР-1. Выявленное снижение уровня продукции ГАГ клетками МПД под воздействием провоспалительных цитокинов может вносить значительный вклад в изменение баланса синтеза и распада межклеточного матрикса и способствовать прогрессированию макроскопически наблюдаемых признаков дегенерации. Также выявлено, что провоспалительные цитокины вызывают выраженные морфологические изменения клеток МПД в трехмерной культуре, характерные дегенерированному МПД – наличие кластеров клеток, увеличение ядерно-цитоплазматического индекса, наличие выпячиваний клеточной стенки и отпочковывания цитоплазмы. Изменение ядерно-цитоплазматических отношений является важным фактором адаптации клеток МПД и реакции на неблагоприятные воздействия.

Таким образом, проведенное исследование показало, что провоспалительные цитокины оказывают непосредственное влияние на клетки МПД в трехмерной культуре, повышая уровень гликолиза и одновременно снижая синтетическую активность как неповрежденных, так и дегенерированных клеток ФК и ПЯ. Полученные нами результаты согласуются с исследованиями ряда авторов, что действия провоспалительных цитокинов сопряжены с дальнейшим увеличением нутритивной потребности клеток МПД, что приводит к дальнейшему снижению уровней глюкозы и рН в нативном МПД, тем самым ухудшая активность и жизнеспособность клеток (Wuertz K. et al., 2009; Bendtsen M. et al., 2016).

Нами предложена концептуальная схема патогенеза дегенерации МПД (Рисунок 33). Под влиянием различных факторов, таких как механический стресс, генетическая предрасположенность, инфекция, старение, курение, запускаются механизмы дегенерации МПД. В патогенезе дегенеративного изменения МПД, представляющего собой сложный стадийный процесс, важное значение отводится

влиянию воспаления. Среди секретируемых провоспалительных цитокинов особое значение отводится ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8. Провоспалительные цитокины способствуют снижению синтетической активности клеток МПД, а также играют большую роль в усилении деградации матрикса посредством усиления экспрессии ММП-1,-2,-3,-9,-13,-14 и ADAMTS-4,-5, участвующих в разрушении агрекана и коллагенов. Потеря агрекана и, следовательно, снижение осмолярности в дегенерированных МПД уменьшает скорость производства внеклеточного матрикса. Под влиянием провоспалительных цитокинов отмечается увеличение нутритивной потребности клеток МПД. Склероз замыкательной пластинки, наблюдаемый с возрастом, способствует снижению поступления кислорода и глюкозы и выведению продуктов метаболизма клеток МПД через капилляры, что также ведет к дефициту питательных веществ внутри МПД. Выделяемые в МПД хемокины стимулируют активацию и инфильтрацию иммунных клеток в ткань МПД, еще более усиливая воспалительный каскад. Это также сопровождается выделением эпидермального фактора роста, фактора роста нервов, что ведет к неоваскулогенезу и вращанию нервных окончаний в МПД, являясь причиной болевого синдрома при дегенерации МПД.



* - по данным литературы

Рисунок 33 – Концептуальная схема патогенеза дегенерации МПД

Перспективным подходом в лечении дегенерации МПД является восстановление способности диска синтезировать полноценный внеклеточный матрикс в условиях дефицита поступления питательных веществ. Как было показано в исследованиях *in vitro* и на животных моделях, применение КМБ-2,-7 и -14 стимулирует экспрессию компонентов межклеточного матрикса МПД. Однако неизвестно, насколько данная терапия изменяла потребность клеток МПД в нутритивной поддержке. Нами исследованы уровень потребления глюкозы и продукции лактата клетками ПЯ и ФК дегенерированного и неповрежденного МПД человека, культивированных в условиях добавления КМБ-2, -7 и -14. Исследуемые КМБ не увеличивали уровень потребления глюкозы или продукции лактата клетками МПД. Можно предположить, что при воздействии КМБ на клетки МПД последние не будут подвергаться голоданию вследствие дефицита глюкозы, который мог бы возникнуть при увеличении ее потребления в замкнутой системе аваскулярного МПД. Что касается пролиферативной активности клеток МПД, отмечены различия в скорости роста клеток ПЯ и ФК, свидетельствуя о различной степени толерантности клеточных популяций МПД к дегенерации либо о преимущественной роли ПЯ в клеточном звене дегенерации МПД. Установлено, что КМБ-7 увеличивает пролиферативную активность клеток дегенерированного ПЯ, а КМБ-14 – клеток дегенерированных ПЯ и ФК, не влияя на пролиферативную активность клеток неповрежденного МПД. Оценка продукции ГАГ клетками ПЯ и ФК в средах с добавлением КМБ-2, КМБ-7 и КМБ-14 показала позитивный эффект КМБ-7 в отношении клеток неповрежденных ПЯ и ФК и КМБ-14 в отношении клеток неповрежденного ПЯ. Таким образом, восстановление способности диска синтезировать полноценный внеклеточный матрикс, богатый протеогликанами и коллагенами, является ключевой задачей в коррекции и профилактике дегенеративно-дистрофических процессов в МПД. Отсутствие влияния КМБ-7 и -14 на нутритивный статус клеток МПД и в то же время их стимулирующий эффект в отношении недегенерированных клеток на синтез ГАГ, основного компонента межклеточного матрикса МПД, позволяет рассматривать КМБ как перспективную терапию на ранних стадиях дегенерации МПД или поддерживающую терапию

совместно с имплантацией клеток (Рисунок 34). Потенциальное преимущество КМБ-14 состоит в том, что он имеет остеоиндуктивные свойства только при значительно более высоких концентрациях, то есть потенциально лишен негативного эффекта чрезмерной оссификации при терапии дегенерации МПД.

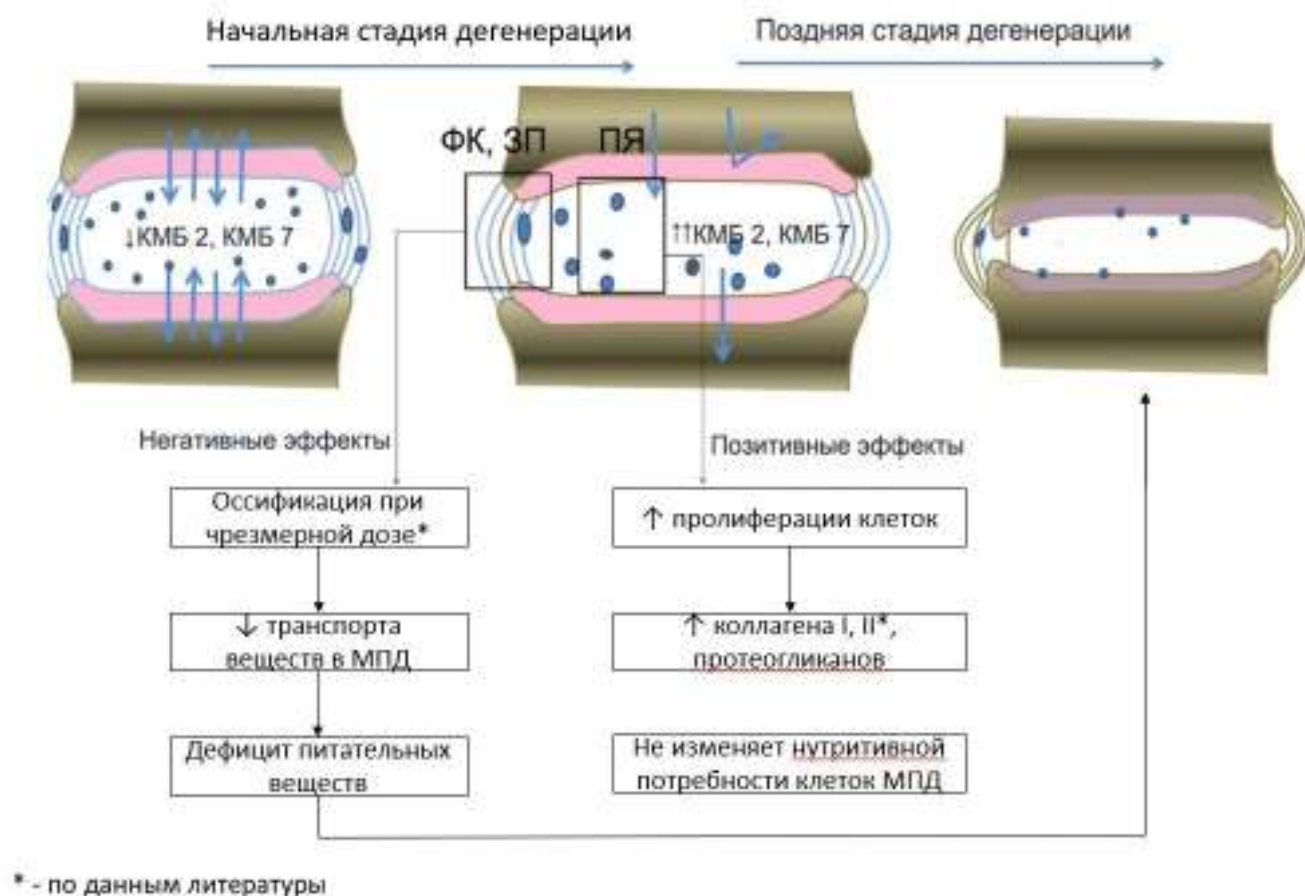


Рисунок 34. Схема саногенеза дегенерации МПД с использованием костных морфогенетических белков

Таким образом, полученные результаты раскрывают некоторые звенья патогенеза дегенерации МПД и позволяют целенаправленно влиять на механизмы саногенеза при его репарации.

ВЫВОДЫ

1. ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 оказывают значимое увеличение продукции лактата неповрежденными клетками МПД на 25 % и дегенерированными – на 40 %.

2. КМБ-2, -7, -14 не усиливают потребление глюкозы и продукцию лактата клетками МПД, что может свидетельствовать об отсутствии дополнительной нутритивной нагрузки на МПД.

3. Провоспалительные цитокины снижают синтез ГАГ в 1,7 раз неповрежденными и в 1,8 раза дегенерированными клетками МПД, что является важным звеном в патогенезе прогрессирования дегенерации МПД.

4. КМБ-7 и -14 оказывают влияние на синтетическую активность клеток МПД в культуре: КМБ-7 – на 20 % увеличивает синтез протеогликанов неповрежденных клеток ПЯ и ФК, а КМБ-14 – на 15 % увеличивает синтез протеогликанов неповрежденных клеток ПЯ.

5. КМБ-7 увеличивает на 20 % пролиферативную активность дегенерированных клеток ПЯ, а КМБ-14 на столько же увеличивает пролиферативную активность дегенерированных клеток ПЯ и ФК, не влияя на пролиферативную активность неповрежденных клеток МПД.

6. Провоспалительные цитокины вызывают выраженные морфологические изменения клеток МПД в трехмерной культуре, характерные дегенерированному МПД. Клетки ПЯ и ФК как неповрежденного, так и дегенерированного МПД имеют схожие морфологические формы и не проявляют очевидных различий в присутствии КМБ.

7. Степень дегенерации исследованных МПД по МРТ классификации Pfirrmann на основе оценки T2-изображений имела значимую корреляцию с КД ПЯ ($r = -0,69$, $p < 0,05$). В МПД с умеренной степенью дегенерации диффузионный транспорт в значимой степени ассоциирован с изменением состава межклеточного матрикса и спектром синтезируемого коллагена, сопровождаясь появлением коллагенов X и XI типов и хондроцитов с признаками дистрофии. С другой

стороны, при дегенерации МПД с увеличением продукции провоспалительных цитокинов повышается нутритивная потребность клеток МПД, что в совокупности оказывает влияние на клеточное звено патогенеза дегенерации МПД.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ГАГ – гликозаминогликаны

ДВ – диффузионно-взвешенный

дКПЯ – дегенерированные клетки пульпозного ядра

дКФК – дегенерированные клетки фиброзного кольца

ЗОФК – задняя область фиброзного кольца

ИЛ – интерлейкин

КД – коэффициент диффузии

КМБ – костный морфогенетический белок

ММП – матриксные металлопротеиназы

МПД – межпозвонковый диск

МРТ – магнитно-резонансная томография

нКПЯ – неповрежденные клетки пульпозного ядра

нКФК – неповрежденные клетки фиброзного кольца

ПОФК – передняя область фиброзного кольца

ПЯ – пульпозное ядро

ТФР- β – трансформирующий фактор роста

ФК – фиброзное кольцо

ФМА – форбол-12-миристат-13-ацетат

ФНО- α – фактор некроза опухоли- α

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) – дезинтегрины и адамализины с тромбоспондиновым модулем

DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12) – модифицированная

Дульбекко среда Игла в сочетании со средой Хэма

K_s – коэффициент сферичности ядра

M – среднее значение

$R_{n/c}$ – ядерно-цитоплазматическое отношение

SD – стандартное отклонение

V_c – объем цитоплазмы

V_{cell} – объем всей клетки

V_n – объем цитоплазмы ядра

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байков, Е.С. Прогнозирование результатов хирургического лечения грыж поясничных межпозвонковых дисков : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.18 / Байков Евгений Сергеевич. – Новосибирск, 2014. – 25 с.
2. Бенгус, Л.М. Хрящевая замыкательная пластинка и ее роль в дегенерации диска (аналитический обзор литературы) / Л.М. Бенгус, Н.В. Дедух // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2012. – № 2. – С. 50–57.
3. Булатов, А.А. Применение костных морфогенетических белков в эксперименте и клинике (обзор литературы) / А.А. Булатов, В.И. Савельев, А.В. Калинин // Травматология и ортопедия России. – 2005. – № 1. – С. 46–54.
4. Бывальцев, В.А. Диффузионно-взвешенная магнитно-резонансная томография в диагностике дегенерации межпозвонковых дисков пояснично-крестцового отдела позвоночника / В.А. Бывальцев, И.А. Степанов, А.А. Калинин, Е.Г. Белых // Вестник рентгенологии и радиологии. – 2016. – № 97 (6). – С. 357–364.
5. Васильева, И.Г. Дегенерация межпозвонковых дисков и методы ее биологической коррекции / И.Г. Васильева, М.В. Хижняк, И.Н. Шуба, Ю.Г. Гафийчук // Украинский нейрохирургический журнал. – 2010. – № 1. – С. 16–23.
6. Влияние факторов, секретируемых тканью плаценты, на секрецию цитокинов моноцитоподобной линией клеток ТНР-1 / Я.С. Онохина, Т.Ю. Львова, Д.З. Цицкарава и др. // Медицинская иммунология. – 2013. – № 3. – С. 227–234.
7. Дедух, Н.В. Агррекан / Н.В. Дедух // Боль. Суставы. Позвоночник. – 2012. – № 4(8). – С. 26–28.
8. Ким, И.И. Выделение и культивирование хондроцитов, полученных из разных источников / И.И. Ким // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 4(6). – С. 48–50.
9. Кобызев, А.Е. Гомеостаз межпозвонковых дисков в норме и патологии /

- А.Е. Кобызов // Казанский медицинский журнал. – 2012. – Т. 2, № 93. – С. 304–307.
10. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. – 364 с.
 11. Лабораторный практикум по биохимии и биофизике / В.И. Резяпкин, В.С. Слышенков, И.Б. Заводник, и др. // Гродно : ГрГУ, 2009. – 175 с.
 12. Нестабильные формы дегенеративных поражений межпозвоночных дисков пояснично-крестцового отдела позвоночника – дифференцированный подход к хирургическому лечению / В.А. Бывальцев, В.А. Сороковиков., А.А. Калинин и др. // Иркутск : НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН, 2014. – 20 с.
 13. Плотникова, М.А. Мультиплексные методы определения вирус-индуцированной экспрессии цитокинов на основе микрочипов и ПЦР : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.02 / Плотникова Марина Александровна. – Санкт-Петербург, 2014. – 24 с.
 14. Различные методики дискэктомии при грыжах поясничных межпозвоночных дисков: сравнительный анализ результатов через 6 месяцев после операции / В.А. Бывальцев, В.А. Сороковиков, А.В. Егоров и др. // Acta Biomedica Scientifica. – 2011. – № 4-1. – С. 4–47.
 15. Русова, Т.В. Гликозаминогликаны тканей межпозвоночных дисков у больных идиопатическим сколиозом / Т.В. Русова, О.Н Кулешова, Д.В. Жуков // Хирургия позвоночника. – 2006. – № 3. – С. 84–87.
 16. Симонович, А.Е. Биомеханические эффекты декомпрессивных и стабилизирующих операций при поясничном остеохондрозе / А.Е. Симонович, А.В. Гладков, Е.А. Черепанов // Хирургия позвоночника. – 2005. – №2. – С. 62–69.
 17. Тарбеева, Г.Р. Дискогенная боль в спине: возможности патогенетической терапии / Г.Р. Тарбеева // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. – № 12. – С. 162–168.
 18. Фасеточная фиксация в комбинации с межтеловым спондилодезом: сравнительный анализ и клинический опыт нового способа хирургического

- лечения пациентов с дегенеративными заболеваниями поясничного отдела позвоночника / В.А. Бывальцев, А.А. Калинин, А.К. Оконешникова и др. // Вестник РАМН. – 2016. – Т. 71, № 5. – С. 375–384.
19. Цитокиновые механизмы дегенерации межпозвонкового диска / В.А. Бывальцев, И.А. Степанов, Е.Г. Белых и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2015. – № 5. – С. 17–21.
 20. Юхта, М.С. Кριοконсервированные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки стимулируют репаративный хондрогенез в дегенеративно измененном межпозвонковом диске / М.С. Юхта, Н.А. Волкова, Е.П. Жуликова, Е.И. Гончарук // Гены и клетки. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 29–34.
 21. 2002 SSE award competition in basic science: Expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption / C. Weiler, A.G. Nerlich, B.E. Bachmeier et al. // Eur Spine J. – 2002. – Vol. 11(4). – P. 308–320.
 22. 2004 Young investigator award winner: Vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration / L.M. Benneker, P.F. Heini, M. Alini et al. // Spine (Phila Pa 1976). – 2005. – Vol. 30(2). – P. 167–173.
 23. A biological approach to treating disc degeneration: Not for today, but maybe for tomorrow / M. Alini, P.J. Roughley, J. Antoniou et al. // Eur Spine J. – 2002. – Vol. 11 Suppl 2. – P. S215–220.
 24. A combinatorial relative mass value evaluation of endogenous bioactive proteins in three-dimensional cultured nucleus pulposus cells of herniated intervertebral discs: Identification of potential target proteins for gene therapeutic approaches / D.S. Mern, J. Fontana, A. Beierfuss et al. // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(11). – P. e81467.
 25. A new in-vitro model to investigate antibiotic penetration of the intervertebral disc / W. Thomas Rde, J.J. Batten, S. Want et al. // J Bone Joint Surg Br. – 1995. – Vol. 77(6). – P. 967–970.
 26. A new non-enzymatic method for isolating human intervertebral disc cells preserves the phenotype of nucleus pulposus cells / X. Tang, W.J. Richardson, R.D. Fitch et al. // Cytotechnology. – 2014. – Vol. 66(6). – P. 979–986.

27. A role for TNF α in intervertebral disc degeneration: a non-recoverable catabolic shift / D. Purmessur, B.A. Walter, P.J. Roughley et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2013. – Vol. 433(1). – P. 151–156.
28. Acidic pH promotes intervertebral disc degeneration: Acid-sensing ion channel -3 as a potential therapeutic target / H.T. Gilbert, N. Hodson, P. Baird et al. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 37360.
29. Activated macrophage-like THP-1 cells modulate annulus fibrosus cell production of inflammatory mediators in response to cytokines / J.H. Kim, R.K. Studer, G.A. Sowa et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2008. – Vol. 33(21). – P. 2253–2259.
30. Adams, M.A. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? / M.A. Adams, P.J. Roughley // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2006. – Vol. 31(18). – P. 2151–2161.
31. Age- and degeneration-related variations in cell density and glycosaminoglycan content in the human cervical intervertebral disc and its endplates. / K.A. Tomaszewski, J.A. Walocha, E. Mizia et al. // *Pol J Pathol.* – 2015. – Vol. 66, № 3. – P. 296–309.
32. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method / M. Sato, T. Asazuma, M. Ishihara et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2003. – Vol. 28(6). – P. 548–553.
33. An, H.S. Intervertebral disc degeneration: Biological and biomechanical factors / H.S. An, K. Masuda, N. Inoue // *J Orthop Sci.* – 2006. – Vol. 11(5). – P. 541–552.
34. Analysis of tissue distribution of TNF- α , TNF- α -receptors, and the activating TNF- α -converting enzyme suggests activation of the TNF- α system in the aging intervertebral disc / B.E. Bachmeier, A.G. Nerlich, C. Weiler et al. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007. – Vol. 1096. – P. 44–54.
35. Andersson, G.B. Epidemiological features of chronic low-back pain / G.B. Andersson // *Lancet.* – 1999. – Vol. 354(9178). – P. 581–585.
36. Antibiotic prophylaxis in surgery of the intervertebral disc. A comparison between gentamicin and cefuroxime / Tai C.C. Tai, S. Want, N.A. Quraishi et al. // *J Bone*

- Joint Surg Br. – 2002. – Vol. 84(7). – P. 1036–1039.
37. Apparent diffusion coefficient of intervertebral discs related to matrix composition and integrity / J. Antoniou, C.N. Demers, G. Beaudoin et al. // *Magn Reson Imaging*. – 2014. – Vol. 22(7). – P. 963–972.
 38. Assessment of apparent diffusion coefficient in normal and degenerated intervertebral lumbar disks: initial experience. / S.M. Kealey, T. Aho, D. Delong et al. // *Radiology*. – 2005. – Vol. 235(2). – P. 569–574.
 39. Association between visual degeneration of intervertebral discs and the apparent diffusion coefficient / J. Niinimäki, O. Ojala, J. Karppinen et al. // *Magn Reson Imaging*. – 2009. – Vol. 27(5). – P. 641–647.
 40. Associations of 25 structural, degradative, and inflammatory candidate genes with lumbar disc desiccation, bulging, and height narrowing. / T. Videman, J. Saarela, J. Kaprio et al. // *Arthritis Rheum*. – 2009. – Vol. 60(2). – P. 470–481.
 41. Bernick, S. Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae / S. Bernick, R. Cailliet // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 1982. – Vol. 7(2). – P. 97–102.
 42. Bibby, S.R. Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells / S.R. Bibby, J.P. Urban // *Eur Spine J*. – 2004. – Vol. 13(8). – P. 695–701.
 43. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc / S.S. Sivan, A.J. Hayes, E. Wachtel et al. // *Eur Spine J*. – 2014. – Vol. 23 Suppl 3. – P. S344–353.
 44. Biologic modification of animal models of intervertebral disc degeneration / J.W. Larson, 3rd, E.A. Levicoff, L.G. Gilbertson et al. // *J Bone Joint Surg Am*. – 2006. – Vol. 88 Suppl 2. – P. 83–87.
 45. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail / S.H. Moon, K. Nishida, L.G. Gilbertson et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2008. – Vol. 33(17). – P. 1850–1855.
 46. Biologic response of degenerative living human nucleus pulposus cells to treatment with cytokines / S.H. Kim, S.U. Kuh, K.N. Kim et al. // *Yonsei Med J*. – 2015. – Vol. 56(1). – P. 277–286.
 47. Biological challenges for regeneration of the degenerated disc using cellular

- therapies / M. Bendtsen, C. Bunger, P. Colombier et al. // *Acta Orthop.* – 2016. – Vol. 87 (sup363). – P. 39–46.
48. Biological treatment approaches for degenerative disk disease: A literature review of *in vivo* animal and clinical data / Y. Moriguchi, M. Alimi, T. Khair et al. // *Global Spine J.* – 2016. – Vol. 6(5). – P. 497–518.
49. Biomechanical and endplate effects on nutrient transport in the intervertebral disc / M.B. Giers, B.T. Munter, K.J. Eyster et al. // *World Neurosurg.* – 2017. – Vol. 99. – P. 395–402.
50. Blanquer, S.B. Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs / S.B. Blanquer, D.W. Grijpma, A.A. Poot. // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2015. – Vol. 84. – P. 172–187.
51. Bone morphogenetic proteins and degenerative disk disease / K.D. Than, S.U. Rahman, M.J. Vanaman et al. // *Neurosurgery.* – 2012. – Vol. 70(4). – P. 996–1002; discussion 1002.
52. Bosshart, H. THP-1 cells as a model for human monocytes / H. Bosshart, M. Heinzemann // *Ann Transl Med.* – 2016. – Vol. 4(21). – P. 438.
53. Brodke, D.S. Nonsurgical management of low back pain and lumbar disk degeneration / D.S. Brodke, S.M. Ritter // *Instr Course Lect.* – 2005. – Vol. 54. – P. 279–286.
54. Cell-seeded adhesive biomaterial for repair of annulus fibrosus defects in intervertebral discs / M.A. Cruz, W.W. Hom, T.J. DiStefano et al. // *Tissue Eng Part A.* – 2018. – Vol. 24(3-4). – P. 187–198.
55. Chandraraj, S. Disc herniations in the young and end-plate vascularity / S. Chandraraj, C.A. Briggs, K. Opekin // *Clin Anat.* – 1998. – Vol. 11(3). – P. 171–176.
56. Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis / V.C. Duance, J.K. Crean, T.J. Sims et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 1998. – Vol. 23. – P. 2545–2551.
57. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the anulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration / G. Cs-Szabo, D. Ragasa-

- San Juan, V. Turumella et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2002. – Vol. 27(20). – P. 2212–2219.
58. Chanput, W. THP-1 cell line: An *in vitro* cell model for immune modulation approach / W. Chanput, J.J. Mes, H.J. Wichers // *Int Immunopharmacol*. – 2014. – Vol. 23(1). – P. 37–45.
59. Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of the intervertebral disc / R.J. Errington, K. Puustjarvi, I.R. White et al. // *J Anat*. – 1998. – Vol. 192 (Pt 3). – P. 369–378.
60. Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression / G. Sowa, G. Vadala, R. Studer et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2008. – Vol. 33(17). – P. 1821–1828.
61. Chondroadherin fragmentation mediated by the protease HTRA1 distinguishes human intervertebral disc degeneration from normal aging / B. Akhatib, P. Onnerfjord, R. Gawri et al. // *J Biol Chem*. – 2013. – Vol. 288(26). – P. 19280–19287.
62. Chou, A.I. Distinct intervertebral disc cell populations adopt similar phenotypes in three-dimensional culture / A.I. Chou, A.T. Reza, S.B. Nicoll // *Tissue Eng Part A*. – 2008. – Vol. 14(12). – P. 2079–2087.
63. Chou, R. Low back pain / R. Chou // *Annals of Internal Medicine*. – 2014. – Vol. 160(11). – P. ITC6-1-1.
64. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science / N. Boos, S. Weissbach, H. Rohrbach et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2002. – Vol. 27(23). – P. 2631–2644.
65. Clinical experience in cell-based therapeutics: Disc chondrocyte transplantation a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc / H.J. Meisel, V. Siodla, T. Ganey et al. // *Biomol Eng*. – 2007. – Vol. 24(1). – P. 5–21.
66. Clinical experience in cell-based therapeutics: Intervention and outcome / H.J. Meisel, T. Ganey, W.C. Hutton et al. // *Eur Spine J*. – 2006. – Vol. 15 Suppl 3. – P. S397–405.

67. Comparison of growth factor and cytokine expression in patients with degenerated disc disease and herniated nucleus pulposus / S. Lee, C.S. Moon, D. Sul et al. // *Clin Biochem.* – 2009. – Vol. 42(15). – P. 1504–1511.
68. Comparison of oxygen consumption rates of nondegenerate and degenerate human intervertebral disc cells / S.E. Cisewski, Y. Wu, B.J. Damon et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2018. – Vol. 43(2). – P. E60–E67.
69. Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: An *in vivo* mouse model and finite-element study / J.C. Lotz, O.K. Colliou, J.R. Chin et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 1998. – Vol. 23(23). – P. 2493–2506.
70. Construction strategy and progress of whole intervertebral disc tissue engineering / Q. Yang, H.W. Xu, S. Hurday et al. // *Orthop Surg.* – 2016. – Vol. 8(1). – P. 11–18.
71. Contributions of fluid convection and electrical migration to transport in cartilage: Relevance to loading / A.M. Garcia, E.H. Frank, P.E. Grimshaw et al. // *Arch Biochem Biophys.* – 1996. – Vol. 333(2). – P. 317–325.
72. Coric, D. Prospective study of disc repair with allogeneic chondrocytes presented at the 2012 joint spine section meeting / D. Coric, K. Pettine, A. Sumich, M.O. Boltes // *J Neurosurg Spine.* – 2013. – Vol. 18(1). – P. 85–95.
73. Correlation between diffusion in lumbar intervertebral disks and lumbar artery status: Evaluation with fresh blood imaging technique / O. Tokuda, M. Okada, T. Fujita et al. // *J Magn Reson Imaging.* – 2007. – Vol. 25(1). – P. 185–191.
74. Correlation of diffusion in lumbar intervertebral disks with occlusion of lumbar arteries: A study in adult volunteers / M. Kurunlahti, L. Kerttula, J. Jauhiainen et al. // *Radiology.* – 2001. – Vol. 221(3). – P. 779–786.
75. Coulson-Thomas, V. Dimethylmethylene blue assay / V. Coulson-Thomas, T.F. Gesteira // *Bio-protocol.* – 2014. – Vol 4(18). – P. e1236
76. Current concepts in intervertebral disc restoration / A.D. Diwan, H.K. Parvataneni, S.N. Khan et al. // *Orthop Clin North Am.* – 2000. – Vol. 31(3). – P. 453–464.
77. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response / S. de Oliveira, C.C. Reyes-Aldasoro, S. Candel et al. // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 190(8). – P. 4349–4359.

78. Cytokine and chemokine profile changes in patients with lower segment lumbar degenerative spondylolisthesis / J. Sutovsky, M. Benco, M. Sutovska et al. // *Int J Surg.* – 2017. – Vol. 43. – P. 163–170.
79. Cytokine expression in the epidural space: A model of noncompressive disc herniation-induced inflammation / J.M. Cuellar, P.M. Borges, V.G. Cuellar et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2013. – Vol. 38(1). – P. 17–23.
80. Cytokine regulation of facilitated glucose transport in human articular chondrocytes / A.R. Shikhman, D.C. Brinson, J. Valbracht et al. // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 167(12). – P. 7001–7008.
81. Decellularized bovine intervertebral disc as a natural scaffold for xenogenic cell studies / L.K. Chan, V.Y. Leung, V. Tam et al. // *Acta Biomater.* – 2013. – Vol. 9(2). – P. 5262–5272.
82. Debating the value of spine surgery / E.N. Hanley Jr., H.N. Herkowitz, J.S. Kirkpatrick et al. // *Bone Joint Surg Am.* – 2010. – Vol. 92(5). – P. 1293–1304.
83. Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: Restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta / F. Lemare, N. Steimberg, C. Le Griel et al. // *J Cell Physiol.* – 1998. – Vol. 176(2). – P. 303–313.
84. Detection of extracellular matrix degradation in intervertebral disc degeneration by diffusion magnetic resonance spectroscopy / A.M. Wang, P. Cao, A. Yee et al. // *Magn Reson Med.* – 2015. – Vol. 73(5). – P. 1703–1712.
85. Difference in energy metabolism of annulus fibrosus and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc / J.C. Salvatierra, T.Y. Yuan, H. Fernando et al. // *Cell Mol Bioeng.* – 2011. – Vol. 4(2). – P. 302–310.
86. Differences in chain usage and cross-linking specificities of cartilage type V/XI collagen isoforms with age and tissue / J.J. Wu, M.A. Weis, L.S. Kim et al. // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol. 284(9). – P. 5539–5545.
87. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin d3 / H. Schwende, E. Fitzke, P. Ambs et al. // *J Leukoc Biol.* – 1996. – Vol. 59(4). – P. 555–561.

88. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 / C.J.L. Murray, T. Vos, R. Lozano et al. // *Lancet*. – 2012. – Vol. 380(9859). – P. 2197–2223
89. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc / T. Ganey, J. Libera, V. Moos et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2003. – Vol. 28(23). – P. 2609–2620.
90. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: A report of two case studies / T. Yoshikawa, Y. Ueda, K. Miyazaki et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2010. – Vol. 35(11). – P. E475–480.
91. Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function / G. Pattappa, Z. Li, M. Peroglio et al. // *J Anat*. – 2012. – Vol. 221(6). – P. 480–496.
92. Effect of molecular weight on the diffusion of contrast media into cartilage / T.J. Perlewitz, V.M. Haughton, L.H. Riley, 3rd // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 1997. – Vol. 22(23). – P. 2707–2710.
93. Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc--*in vitro* bovine study and *in vivo* rabbit disc degeneration model study / T. Chujo, H.S. An, K. Akeda et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2006. – Vol. 31(25). – P. 2909–2917.
94. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage / M.B. Schmidt, V.C. Mow, L.E. Chun et al. // *J Orthop Res*. – 1990. – Vol. 8(3). – P. 353–363.
95. Effects of secreted factors in culture medium of annulus fibrosus cells on microvascular endothelial cells: Elucidating the possible pathomechanisms of matrix degradation and nerve in-growth in disc degeneration / H.J. Moon, T. Yurube, T.P. Lozito et al. // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2014. – Vol. 22(2). – P. 344–354.
96. Elevated Glucose Levels Preserve Glucose Uptake, Hyaluronan Production, and Low Glutamate Release Following Interleukin-1 β Stimulation of Differentiated Chondrocytes / V. R. Sopsakis, R. Wickelgren, V. Sukonina et al. // *Cartilage*. – 2018. – Vol. 0(0). – P. 1–13.
97. Energy metabolism of intervertebral disc under mechanical loading / C. Wang,

- S. Gonzales, H. Levene et al. // *J Orthop Res.* – 2013. – Vol. 31(11). – P. 1733–1738.
98. Engineering of polymer-based grafts with cells derived from human nucleus pulposus tissue of the lumbar spine / A.A. Hegewald, A. Enz, M. Endres et al. // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2011. – Vol. 5(4). – P. 275–282.
99. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc / M.V. Risbud, A. Guttapalli, T.T. Tsai et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2007. – Vol. 32(23). – P. 2537–2544.
100. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc / D. Sakai, Y. Nakamura, T. Nakai et al. // *Nat Commun.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1264.
101. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: A study in surgical specimen and autopsy controls / C. Weiler, A.G. Nerlich, B.E. Bachmeier et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2005. – Vol. 30(1). – P. 44–53; discussion 54.
102. Eyre, D.R. Collagen polymorphisms of the intervertebral disc / D.R. Eyre, Y. Matsui, J.J. Wu // *Biochem Soc Trans.* – 2002. – Vol. 30(Pt 6). – P. 844-848.
103. Factors associated with lumbar intervertebral disc degeneration in the elderly / M. Hangai, K. Kaneoka, S. Kuno et al. // *Spine J.* – 2008. – Vol. 8(5). – P. 732–740.
104. Fas ligand plays an important role for the production of pro-inflammatory cytokines in intervertebral disc nucleus pulposus cells / J. Yamamoto, K. Maeno, T. Takada et al. // *J Orthop Res.* – 2013. – Vol. 31(4). – P. 608–615.
105. FasL expression on human nucleus pulposus cells contributes to the immune privilege of intervertebral disc by interacting with immunocytes / Z.H. Liu, Z. Sun, H.Q. Wang et al. // *Int J Med Sci.* – 2013. – Vol. 10(8). – P. 1053-60.
106. Ferguson, S.J. Fluid flow and convective transport of solutes within the intervertebral disc / S.J. Ferguson, K. Ito, L.P. Nolte // *J Biomech.* – 2004. – Vol. 37(2). – P. 213–221.
107. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise et al. // *Nat Methods.* – 2012. – Vol. 9(7). – P. 676–682.
108. Freemont, A.J. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and

- discogenic back pain / A.J. Freemont // *Rheumatology (Oxford)*. – 2009. – Vol. 48(1). – P. 5–10.
109. Genetic alterations in intervertebral disc disease / N.L. Martirosyan, A.A. Patel, A. Carotenuto et al. // *Front Surg*. – 2016. – Vol. 3. – P.59.
110. Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration / J.E. Mayer, J.C. Iatridis, D. Chan et al. // *Spine J*. – 2013. – Vol. 13(3). – P. 299–317.
111. Genetic susceptibility of lumbar degenerative disc disease in young Indian adults / S. Rajasekaran, R.M. Kanna, N. Senthil et al. // *Eur Spine J*. – 2015. – Vol. 24(9). – P. 1969–1975.
112. Good, M.C. Turn up the volume: uncovering nucleus size control mechanisms / M.C. Good // *Dev Cell*. – 2015. – Vol. 33(5). – P. 49-497.
113. Growth and differentiation factor-5 contributes to the structural and functional maintenance of the intervertebral disc / C. Feng, H. Liu, Y. Yang et al. // *Cell Physiol Biochem*. – 2015. – Vol. 35(1). – P. 1–16.
114. Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) in the human intervertebral annulus cells and its modulation by IL-1ss and TNF-alpha *in vitro* / H.E. Gruber, G.L. Hoelscher, J.A. Ingram et al. // *Exp Mol Pathol*. – 2014. – Vol. 96(2). – P. 225–229.
115. Hastreiter, D. Regional variations in certain cellular characteristics in human lumbar intervertebral discs, including the presence of alpha-smooth muscle actin / D. Hastreiter, R.M. Ozuna, M. Spector // *J Orthop Res*. – 2001. – Vol. 19(4). – P. 597–604.
116. Haufe, S.M. Intradiscal injection of hematopoietic stem cells in an attempt to rejuvenate the intervertebral discs / S.M. Haufe, A.R. Mork // *Stem Cells Dev*. – 2006. – Vol. 15(1). – P. 136–137.
117. Heywood, H.K. Monolayer expansion induces an oxidative metabolism and ROS in chondrocytes / H.K. Heywood, D.A. Lee // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2008. – Vol. 373(2). – P. 224–229.
118. Horner, H.A. 2001 Volvo award winner in basic science studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc /

- H.A. Horner, J.P. Urban // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2001. – Vol. 26(23). – P. 2543–2549.
119. Hoyland, J.A. Investigation of the role of IL-1 and TNF in matrix degradation in the intervertebral disc / J.A. Hoyland, C. Le Maitre, A.J. Freemont // *Rheumatology (Oxford)*. – 2008. – Vol. 47(6). – P. 809–814.
120. Huang, Y.C. Intervertebral disc regeneration: Do nutrients lead the way? / Y.C. Huang, J.P. Urban, K.D. Luk // *Nat Rev Rheumatol*. – 2014. – Vol. 10(9). – P. 561–566.
121. Human nucleus pulposus cells react to IL-6: Independent actions and amplification of response to IL-1 and TNF-alpha / R.K. Studer, N. Vo, G. Sowa et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2011. – Vol. 36(8). – P. 593–599.
122. Humzah, M.D. Human intervertebral disc: Structure and function / M.D. Humzah, R.W. Soames // *Anat Rec*. – 1988. – Vol. 220(4). – P. 337–356.
123. Hunter, C.J. The three-dimensional architecture of the notochordal nucleus pulposus: novel observations on cell structures in the canine intervertebral disc / C.J. Hunter, J.R. Matyas, N.A. Duncan // *J Anat*. – 2003. – Vol. 202(Pt 3). – P. 279–291
124. Hunter, C.J. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: A species comparison / C.J. Hunter, J.R. Matyas, N.A. Duncan // *J Anat*. – 2004. – Vol. 205(5). – P. 357–362.
125. Iatridis, J.C. Effects of mechanical loading on intervertebral disc metabolism *in vivo* / J.C. Iatridis, J.J. MacLean, P.J. Roughley, M. Alini // *J Bone Joint Surg Am*. – 2006. – Vol. 88 Suppl 2. – P. 41–46.
126. Immunolocalization of bone morphogenetic protein and its receptors in degeneration of intervertebral disc / R. Takae, S. Matsunaga, N. Origuchi et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 1999. – Vol. 24(14). – P. 1397–1401.
127. Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration. / N. Boos, A.G. Nerlich, I. Wiest et al. // *Histochem Cell Biol*. – 1997. – Vol. 108, № 6. – P. 471–480.
128. Induction of macrophage function in human THP-1 cells is associated with rewiring of MAPK signaling and activation of MAP3K7 (TAK1) protein kinase / E. Richter,

- K. Venz, M. Harms et al. // *Front Cell Dev Biol.* – 2016. – Vol. 4. – P. 21.
129. Induction of proinflammatory cytokine production in intervertebral disc cells by macrophage-like THP-1 cells requires mitogen-activated protein kinase activity / J.J. Park, H.J. Moon, J.H. Park et al. // *J Neurosurg Spine.* – 2016. – Vol. 24(1). – P. 167–175.
130. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration / M. Molinos, C.R. Almeida, J. Caldeira et al. // *J R Soc Interface.* – 2015. – Vol. 12(108). – P. 20150429.
131. Inflammatory cytokines associated with degenerative disc disease control aggrecanase-1 (ADAMTS-4) expression in nucleus pulposus cells through MAPK and NF-kappaB / Y. Tian, W. Yuan, N. Fujita et al. // *Am J Pathol.* – 2013. – Vol. 182(6). – P. 2310–2321.
132. Inflammatory kinetics and efficacy of anti-inflammatory treatments on human nucleus pulposus cells / B.A. Walter, D. Purmessur, M. Likhitpanichkul et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2015. – Vol. 40(13). – P. 955–963.
133. Influence of cytokine inhibitors on concentration and activity of MMP-1 and MMP-3 in disc herniation / S. Genevay, A. Finckh, F. Mezin et al. // *Arthritis Res Ther.* – 2009. – Vol. 11(6). – P. R169.
134. Interleukin-1 receptor antagonist deficient mice provide insights into pathogenesis of human intervertebral disc degeneration / K.L. Phillips, N. Jordan-Mahy, M.J. Nicklin et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2013. – Vol. 72(11). – P. 1860–1867.
135. Intervertebral disc and macrophage interaction induces mechanical hyperalgesia and cytokine production in a herniated disc model in rats / T. Takada, K. Nishida, K. Maeno et al. // *Arthritis Rheum.* – 2012. – Vol. 64(8). – P. 2601–2610.
136. Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture / J.Y. Wang, A.E. Baer, V.B. Kraus et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2001. – Vol. 26(16). – P. 1747–1751.
137. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: A pilot study / L. Orozco, R. Soler, C. Morera et al. // *Transplantation.* – 2011. – Vol. 92(7). – P. 822–828.

138. Intervertebral disc repair with activated nucleus pulposus cell transplantation: A three-year, prospective clinical study of its safety / J. Mochida, D. Sakai, Y. Nakamura et al. // *Eur Cell Mater.* – 2015. – Vol. 29. – P. 202–212.
139. Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments / C.K. Kepler, D.G. Anderson, C. Tannoury et al. // *J Am Acad Orthop Surg.* – 2011. – Vol. 19(9). – P. 543–553.
140. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits / H.S. An, K. Takegami, H. Kamada et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2005. – Vol. 30(1). – P. 25–31.
141. Intra-discal injection of autologous, hypoxic cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in five patients with chronic lower back pain: A long-term safety and feasibility study / C. Elabd, C.J. Centeno, J.R. Schultz et al. // *J Transl Med.* – 2016. – Vol. 14. – P. 253.
142. Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs / K. Miyamoto, K. Masuda, J.G. Kim et al. et al. // *Spine J.* – 2006. – Vol. 6(6). – P. 69–703.
143. Iozzo, R.V. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans / R.V. Iozzo, L. Schaefer // *Matrix Biol.* – 2015. – Vol. 42. – P. 11–55.
144. Ishihara, H. Effects of low oxygen concentrations and metabolic inhibitors on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc / H. Ishihara, J.P. Urban // *J Orthop Res.* – 1999. – Vol. 17(6). – P. 829–835.
145. ISSLS prize winner: The innervation of the intervertebral disc: A quantitative analysis / A. Fagan, R. Moore, B. Vernon Roberts et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2003. – Vol. 28(23). – P. 2570–2576.
146. Jackson, A. Transport properties of cartilaginous tissues / A. Jackson, W. Gu // *Curr Rheumatol Rev.* – 2009. – Vol. 5(1). – P. 40.
147. Johnson, W.E. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation / W.E. Johnson, S.M. Eisenstein, S. Roberts // *Connect Tissue Res.* – 2001. – Vol. 42(3). – P. 197–207.

148. Johnson, W.E. Human intervertebral disc cell morphology and cytoskeletal composition: A preliminary study of regional variations in health and disease / W.E. Johnson, S. Roberts // *J Anat.* – 2003. – Vol. 203(6). – P. 605–612.
149. Kandel, R. Tissue engineering and the intervertebral disc: The challenges / R. Kandel, S. Roberts, J.P. Urban // *Eur Spine J.* – 2008. – Vol. 17 Suppl 4. – P. 480–491.
150. Kim, Y.C. Adequate serial monolayer passage number of human intervertebral disc cells for cell therapy -growth and phenotype of cells / Y.C. Kim, K.B. Kim, M.S. Park, S.W. Kim // *J Korean Soc Spine Surg.* – 2010. – Vol 17(2). – P. 57–65.
151. Kluba, T. Human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: Effect of degeneration and culture system on cell phenotype / T. Kluba, T. Niemeyer, C. Gaissmaier, T. Grunder // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2005. – Vol. 30(24). – P. 2743–2748.
152. Le Maitre, C.L. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1beta and TNFalpha expression profile / C.L. Le Maitre, A.J. Freemont, J.A. Hoyland // *Arthritis Res Ther.* – 2007. – Vol. 9(4). – P. R77.
153. Le Maitre, C.L. Expression of cartilage-derived morphogenetic protein in human intervertebral discs and its effect on matrix synthesis in degenerate human nucleus pulposus cells / C.L. Le Maitre, A.J. Freemont, J.A. Hoyland // *Arthritis Res Ther.* – 2009. – Vol. 11(5). – P. R137.
154. Le Maitre, C.L. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc / C.L. Le Maitre, A.J. Freemont, J.A. Hoyland // *J Pathol.* – 2004. – Vol. 204(1). – P. 47–54.
155. Le Maitre, C.L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration / C.L. Le Maitre, A.J. Freemont, J.A. Hoyland // *Arthritis Res Ther.* – 2005. – Vol. 7(4). – P. R732–745.
156. Louis, K.S. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods / K.S. Louis, A.C. Siegel // *Methods Mol Biol.* – 2011. – Vol. 740. – P. 7–12.
157. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration / K. Luoma, H. Riihimaki, R. Luukkonen et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2000. – Vol. 25(4). – P. 487–492.

158. Low level light therapy modulates inflammatory mediators secreted by human annulus fibrosus cells during intervertebral disc degeneration *in vitro* / M.H. Hwang, J.H. Shin, K.S. Kim et al. // Photochem Photobiol. – 2015. – Vol. 91(2). – P. 403–410.
159. Low rate loading-induced convection enhances net transport into the intervertebral disc *in vivo* / S.E. Gullbrand, J. Peterson, R. Mastropolo et al. // Spine J. – 2015. – Vol. 15(5). – P. 1028–1033.
160. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration / C.W. Pfirrmann, A. Metzdorf, M. Zanetti et al. // Spine (Phila Pa 1976). – 2001. – Vol. 26(17). – P. 1873–1878.
161. Maldonado, C.V. Adjacent-level degeneration after cervical disc arthroplasty versus fusion / C.V. Maldonado, R.D. Paz, C.B. Martin // Eur Spine J. – 2011. – Vol. 20 Suppl 3. – P. 403–407.
162. Marchand, F. Investigation of the laminate structure of lumbar disc anulus fibrosus / F. Marchand, A.M. Ahmed // Spine (Phila Pa 1976). – 1990. – Vol. 15(5). – P. 402–410.
163. Masuda, K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors / K. Masuda // Eur Spine J. – 2008. – Vol. 17 Suppl 4. – P. 441–451.
164. Masuda, K. Prevention of disc degeneration with growth factors / K. Masuda, H.S. An // Eur Spine J. – 2006. – Vol. 15 Suppl 3. – P. S422–432.
165. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc / S. Roberts, B. Caterson, J. Menage et al. // Spine (Phila Pa 1976). – 2000. – Vol. 25(23). – P. 3005–3013.
166. Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha in immature bovine and adult human articular cartilage / Y. Sui, J.H. Lee, M.A. DiMicco et al. // Arthritis Rheum. – 2009. – Vol. 60(10). – P. 2985–2996.
167. Mechanical loading affects the energy metabolism of intervertebral disc cells / H.N. Fernando, J. Czamanski, T.Y. Yuan et al. // J Orthop Res. – 2011. – Vol. 29(11).

- P. 1634–1641.
168. Metabolism of the intervertebral disc: Effects of low levels of oxygen, glucose, and pH on rates of energy metabolism of bovine nucleus pulposus cells / S.R. Bibby, D.A. Jones, R.M. Ripley et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2005. – Vol. 30(5). – P. 487–496.
169. Mobasheri, A. Glucose: an energy currency and structural precursor in articular cartilage and bone with emerging roles as an extracellular signaling molecule and metabolic regulator / A. Mobasheri // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2012. – Vol. 3. – P. 153.
170. Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration / A.J. Pockert, S.M. Richardson, C.L. Le Maitre et al. // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60(2). – P. 482–491.
171. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs / N.V. Vo, R.A. Hartman, P.R. Patil et al. // *J Orthop Res.* – 2016. – Vol. 34(8). – P. 1289–1306.
172. Moore, R.J. The vertebral endplate: Disc degeneration, disc regeneration / R.J. Moore // *Eur Spine J.* – 2006. – Vol. 15 Suppl 3. – P. S333–337.
173. Moore, R.J. The vertebral end-plate: What do we know? / R.J. Moore // *Eur Spine J.* – 2000. – Vol. 9(2). – P. 92–96.
174. Mouse growth and differentiation factor-5 protein and DNA therapy potentiates intervertebral disc cell aggregation and chondrogenic gene expression / M. Cui, Y. Wan, D.G. Anderson et al. // *Spine J.* – 2008. – Vol. 8(2). – P. 287–295.
175. Murine nucleus pulposus-derived cells secrete interleukins-1-beta, -6, and -10 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in cell culture / N. Rand, F. Reichert, Y. Floman et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 1997. – Vol. 22(22). – P. 2598–2601.
176. Nagase, H. Elucidating the function of non catalytic domains of collagenases and aggrecanases / H. Nagase, K. Fushimi // *Connect Tissue Res.* – 2008. – Vol. 49(3). – P. 169–174.
177. Nerlich, A.G. Temporo-spatial distribution of blood vessels in human lumbar

- intervertebral discs / A.G. Nerlich, R. Schaaf, B. Walchli, N. Boos // *Eur Spine J.* – 2007. – Vol. 16(4). – P. 547–555.
178. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc / A.J. Freemont, A. Watkins, C. Le Maitre et al. // *J Pathol.* – 2002. – Vol. 197(3). – P. 286–292.
179. Nonviral gene delivery of growth and differentiation factor 5 to human mesenchymal stem cells injected into a 3d bovine intervertebral disc organ culture system / C. Bucher, A. Gazdhar, L.M. Benneker et al. // *Stem Cells Int.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 326828.
180. Notochordal intervertebral disc cells: Sensitivity to nutrient deprivation / T. Guehring, G. Wilde, M. Sumner et al. // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60(4). – P. 1026–1034.
181. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities / J.M. Wozney, V. Rosen, A.J. Celeste et al. // *Science.* – 1988. – Vol. 242(4885). – P. 1528–1534.
182. Nutrient supply and intervertebral disc metabolism / T. Grunhagen, G. Wilde, D.M. Soukane et al. // *J Bone Joint Surg Am.* – 2006. – Vol. 88 Suppl 2. – P. 30–35.
183. Occupational and genetic risk factors associated with intervertebral disc disease / I.M. Virtanen, J. Karppinen, S. Taimela et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2007. – Vol. 32(10). – P. 1129–1134.
184. O'Connell, G.D. Tissue engineering a biological repair strategy for lumbar disc herniation / G.D. O'Connell, J.K. Leach, E.O. Klineberg // *Biores Open Access.* – 2015. – Vol. 4(1). – P. 431–445.
185. Ohshima, H. The effect of lactate and pH on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc / H. Ohshima, J.P. Urban // *Spine (Phila Pa 1976).* – 1992. – Vol. 17(9). – P. 1079–1082.
186. Organ culture bioreactors--platforms to study human intervertebral disc degeneration and regenerative therapy / B. Gantenbein, S. Illien-Junger, S.C. Chan et al // *Curr Stem Cell Res Ther.* – 2015. – Vol. 10(4). – P. 339–352.
187. Osteogenic protein-1 enhances matrix replenishment by intervertebral disc cells previously exposed to interleukin-1 / K. Takegami, E.J. Thonar, H.S. An et al. //

- Spine (Phila Pa 1976). – 2002. – Vol. 27(12). – P. 1318–1325.
188. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model / K. Masuda, Y. Imai, M. Okuma et al. // Spine (Phila Pa 1976). – 2006. – Vol. 31(7). – P. 742–754.
189. Pettine, K.A. Percutaneous injection of autologous bone marrow concentrate cells significantly reduces lumbar discogenic pain through 12 months / K.A. Pettine, M.B. Murphy, R.K. Suzuki, T.T. Sand // Stem Cells. – 2015. – Vol. 33(1). – P. 146–156.
190. Physical limitations to tissue engineering of intervertebral disc cells: Effect of extracellular osmotic change on glycosaminoglycan production and cell metabolism. Laboratory investigation / K. Takeno, S. Kobayashi, K. Negoro et al. // J Neurosurg Spine. – 2007. – Vol. 7(6). – P. 637–644.
191. Potential roles of cytokines and chemokines in human intervertebral disc degeneration: interleukin-1 is a master regulator of catabolic processes / K.L. Phillips, K. Cullen, N. Chiverton et al. // Osteoarthritis Cartilage. – 2015. – Vol. 23(7). – P. 1165–1177.
192. Prevalence and distribution of intervertebral disc degeneration over the entire spine in a population-based cohort: the Wakayama Spine Study / M. Teraguchi, N. Yoshimura, H. Hashizume et al. // Osteoarthritis Cartilage. – 2014. – Vol. 22(1). – P. 104–110.
193. Pritchard, S. Hyperosmotically induced volume change and calcium signaling in intervertebral disk cells: the role of the actin cytoskeleton / S. Pritchard, G.R. Erickson, F. Guilak // Biophys J. – 2002. – Vol. 83(5). – P. 2502–2510.
194. Proinflammatory cytokine expression profile in degenerated and herniated human intervertebral disc tissues / M.F. Shamji, L.A. Setton, W. Jarvis et al. // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62(7). – P. 1974–1982.
195. Proinflammatory cytokines stimulate the expression of nerve growth factor by human intervertebral disc cells / Y. Abe, K. Akeda, H.S. An et al. // Spine (Phila Pa 1976). – 2007. – Vol. 32(6). – P. 635–642.
196. Raj, P.P. Intervertebral disc: Anatomy-physiology-pathophysiology-treatment /

- P.P. Raj // *Pain Pract.* – 2008. – Vol. 8(1). – P. 18–44.
197. Razaq, S. The effect of extracellular pH on matrix turnover by cells of the bovine nucleus pulposus / S. Razaq, R.J. Wilkins, J.P. Urban // *Eur Spine J.* – 2003. – Vol. 12(4). – P. 341–349.
198. Recombinant human osteogenic protein-1 upregulates proteoglycan metabolism of human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells / Y. Imai, K. Miyamoto, H.S. An et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2007. – Vol. 32(12). – P. 1303–1310.
199. Reduced tonicity stimulates an inflammatory response in nucleus pulposus tissue that can be limited by a COX-2-specific inhibitor / B. van Dijk, E. Potier, M. van Dijk et al. // *J Orthop Res.* – 2015. – Vol. 33(11). – P. 1724–1731.
200. Regenerative and immunogenic characteristics of cultured nucleus pulposus cells from human cervical intervertebral discs / S. Stich, M. Stolk, P.P. Girod et al. // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10(5). – P. e0126954.
201. Region and strain-dependent diffusivities of glucose and lactate in healthy human cartilage endplate / Y. Wu, S.E. Cisewski, N. Wegner et al. // *J Biomech.* – 2016. – Vol. 49(13). – P. 2756–2762.
202. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC / Y. Imai, M. Okuma, H.S. An et al. // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2007. – Vol. 32(11). – P. 1197–1205.
203. Ricard-Blum, S. The collagen family. / S. Ricard-Blum // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. a004978.
204. Risbud, M.V. Hypoxic regulation of nucleus pulposus cell survival: From niche to notch / M.V Risbud, E. Schipani, I.M. Shapiro // *Am J Pathol.* – 2010. – Vol. 176(4). – P. 1577–1583.
205. Risbud, M.V. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: Pain and disc content / M.V Risbud, I.M. Shapiro // *Nat Rev Rheumatol.* – 2014. – Vol. 10(1). – P. 44–56.
206. Roberts, S. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification / S Roberts, J.P. Urban, H. Evans, S.M. Eisenstein //

- Spine (Phila Pa 1976). – 1996. – Vol. 21(4). – P. 415–420.
207. Rodrigues-Pinto, R. An understanding of intervertebral disc development, maturation and cell phenotype provides clues to direct cell-based tissue regeneration therapies for disc degeneration / R. Rodrigues-Pinto, S.M. Richardson, J.A. Hoyland // *Eur Spine J.* – 2014. – Vol. 23(9). – P. 1803–1814.
208. Role of growth differentiation factor-5 and bone morphogenetic protein type II receptor in the development of lumbar intervertebral disc degeneration / Y.F. Li, X.Z. Tang, C.G. Liang et al. // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – Vol. 8(1). – P. 719–726.
209. Roughley, P.J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix / P.J. Roughley // *Spine.* – 2004. – Vol. 29(23). – P. 2691–2699.
210. Sakai, D. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease / D. Sakai, S. Grad // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2015. – Vol. 84. – P. 159–171.
211. Sakai, D. Cell therapy for intervertebral disc repair: Clinical perspective / D. Sakai J. Schol // *J Orthop Translat.* – 2017. – Vol. 9. – P. 8–18.
212. Sakai, D. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: Obstacles and solutions / D. Sakai, G.B. Andersson // *Nat Rev Rheumatol.* – 2015. – Vol. 11(4). – P. 243–256.
213. Schollum, M.L. A microstructural investigation of intervertebral disc lamellar connectivity: Detailed analysis of the translamellar bridges / M.L. Schollum, P.A. Robertson, N.D. Broom // *J Anat.* – 2009. – Vol. 214(6). – P. 805–816.
214. Selard, E. Finite element study of nutrient diffusion in the human intervertebral disc / E. Selard, A. Shirazi-Adl, J.P. Urban // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2003. – Vol. 28(17). – P. 1945–1953; discussion 1953.
215. Shirazi-Adl, A. Analysis of cell viability in intervertebral disc: effect of endplate permeability on cell population / A. Shirazi-Adl, M. Taheri, J.P. Urban // *J Biomech.* – 2010. – Vol. 43(7). – P. 1330–1336.
216. Sprouse, R. Treatment: Current treatment recommendations for acute and chronic undifferentiated low back pain / R. Sprouse // *Prim Care.* – 2012. – Vol. 39(3). – P. 481–486.

217. Stem cells for cartilage repair: Preclinical studies and insights in translational animal models and outcome measures / M. Lo Monaco, G. Merckx, J. Ratajczak et al. // *Stem Cells Int.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 9079538.
218. Structure and biology of the intervertebral disk in health and disease / W.C. Chan, K.L. Sze, D. Samartzis et al.// *Orthop Clin North Am.* – 2011. – Vol. 42(4). – P. 447–464, vii.
219. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair / K.W. Lo, B.D. Ulery, K.M. Ashe et al. // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2012. – Vol. 64(12). – P. 1277–1291.
220. Substance P stimulates production of inflammatory cytokines in human disc cells / C.K. Kepler, D.Z. Markova, A.S. Hilibrand et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2013. – Vol. 38(21). – P. E1291–1299.
221. Suppressive effect of hepatitis B virus on the induction of interleukin-1 beta and interleukin-6 gene expression in the THP-1 human monocytic cell line / J. Oquendo, S. Dubanchet, F. Capel et al. // *Eur Cytokine Netw.* – 1996. – Vol. 7(4). – P. 793–800.
222. Swanson, J.A. Cellular dimensions affecting the nucleocytoplasmic volume ratio / J.A. Swanson, M. Lee, P.E. Knapp// *J Cell Biol.* – 1991. – Vol. 115(4). – P. 941–948.
223. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration / C.Q. Zhao, L.M. Wang, L.S. Jiang, et al. // *Ageing Res Rev.* – 2007. – Vol. 6(3). – P. 247–261.
224. The cytokine and chemokine expression profile of nucleus pulposus cells: Implications for degeneration and regeneration of the intervertebral disc / K.L. Phillips, N. Chiverton, A.L. Michael et al // *Arthritis Res Ther.* – 2013. – Vol. 15(6). – P. R213.
225. The effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2, recombinant human bone morphogenetic protein-12, and adenoviral bone morphogenetic protein-12 on matrix synthesis in human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells / L. Gilbertson, S.H. Ahn, P.N. Teng et al. et al. // *Spine J.* – 2008. – Vol. 8(3). – P. 449–456.
226. The evidence on surgical interventions for low back disorders, an overview of systematic reviews / W.C. Jacobs, S.M. Rubinstein, P.C. Willems et al.// *Eur Spine*

- J. – 2013. – Vol. 22(9). – P. 1936–1949.
227. The global burden of low back pain: Estimates from the global burden of disease 2010 study / D. Hoy, L. March, P. Brooks et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2014. – Vol. 73(6). – P. 968–974.
228. The Holy Grail of orthopedic surgery: Mesenchymal stem cells-their current uses and potential applications / R. Berebichez-Fridman, R. Gomez-Garcia, J. Granados-Montiel, et al. // *Stem Cells Int.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 2638305.
229. The human lumbar intervertebral disc: Evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration / J. Antoniou, T. Steffen, F. Nelson et al. // *J Clin Invest.* – 1996. – Vol. 98(4). – P. 996–1003.
230. The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. / P. Roughley, D. Martens, J. Rantakokko et al. // *Eur Cell Mater.* – 2006. – Vol. 11. – P. 1–7.
231. The molecular basis of intervertebral disc degeneration / C.K. Kepler, R.K. Ponnappan, C.A. Tannoury et al. // *Spine J.* – 2013. – Vol. 13(3). – P. 318–330.
232. The osseous endplates in lumbar vertebrae: thickness, bone mineral density and their associations with age and disk degeneration / Y. Wang, M.C. Battie, S.K. Boyd et al. // *Bone.* – 2011. – Vol. 48(4). – P. 804–809.
233. The region-dependent biomechanical and biochemical properties of bovine cartilaginous endplate / Y. Wu, S.E. Cisewski, B.L. Sachs et al. // *J Biomech.* – 2015. – Vol. 48(12). – P. 3185–3191.
234. The role of bone morphogenetic proteins 2, 7, and 14 in approaches for intervertebral disk restoration / E. Belykh, M. Giers, L. Bardonova et al. // *World Neurosurg.* – 2015. – Vol. 84(4). – P. 871–873.
235. The role of endplate poromechanical properties on the nutrient availability in the intervertebral disc / A. Malandrino, D. Lacroix, C. Hellmich et al. // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2014. – Vol. 22(7). – P. 1053–1060.
236. The structure and degradation of aggrecan in human intervertebral disc / P.J. Roughley, L.I. Melching, T.F. Heathfield et al. // *Eur Spine J.* – 2006. – Vol. 15

Suppl 3. – P. S326–332.

237. TNF-alpha and IL-1beta promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type i motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc / J. Wang, D. Markova, D.G. Anderson et al. // *J Biol Chem.* – 2011. – Vol. 286(46). – P. 39738–39749.
238. TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues / T. Ohba, H. Haro, T. Ando et al. // *J Orthop Res.* – 2009. – Vol. 27(2). – P. 229–235.
239. Transplantation of allogenic nucleus pulposus cells attenuates intervertebral disc degeneration by inhibiting apoptosis and increasing migration / W. Wang, G. Deng, Y. Qiu, et al. // *Int J Mol Med.* – 2018. – Vol. 41(5). – P. 2553–2564.
240. Tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-dependent induction of CCL3 expression by nucleus pulposus cells promotes macrophage migration through CCR1 / J. Wang, Y. Tian, K.L. Phillips et al. // *Arthritis Rheum.* – 2013. – Vol. 65(3). – P. 832–842.
241. Tumor necrosis factor-alpha levels correlate with postoperative pain severity in lumbar disc hernia patients: Opposite clinical effects between tumor necrosis factor receptor 1 and 2 / P. Andrade, V. Visser-Vandewalle, M. Philippens et al. // *Pain.* – 2011. – Vol. 152(11). – P. 2645–2652.
242. Tumor necrosis factor-alpha modulates matrix production and catabolism in nucleus pulposus tissue / C.A. Seguin, R.M. Pilliar, P.J. Roughley et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2005. – Vol. 30(17). – P. 1940–1948.
243. Tumor necrosis factor-alpha-immunoreactive cells in nucleus pulposus in adolescent patients with lumbar disc herniation / S. Ohtori, G. Inoue, Y. Eguchi et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2013. – Vol. 38(6). – P. 459–462.
244. Urban, J.P. Nutrition of the intervertebral disc / J.P. Urban, S. Smith, J.C. Fairbank // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2004. – Vol. 29(23). – P. 2700–2709.
245. Urban, J.P. The role of the physicochemical environment in determining disc cell behaviour / J.P. Urban // *Biochem Soc Trans.* – 2002. – Vol. 30(Pt 6). – P. 858–864.
246. Vedicherla, S. Cell-based therapies for intervertebral disc and cartilage regeneration-

- current concepts, parallels, and perspectives / S. Vedicherla, C.T. Buckley // *J Orthop Res.* – 2017. – Vol. 35(1). – P. 8–22.
247. Viscoelastic properties of intervertebral disc cells. Identification of two biomechanically distinct cell populations / F. Guilak, H.P. Ting-Beall, A.E. Baer et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 1999. – Vol. 24(23). – P. 2475–2483.
248. Walker, M.H. Molecular basis of intervertebral disc degeneration / M.H. Walker, D.G. Anderson // *Spine J.* – 2004. – Vol. 4(6 Suppl). – P. 158S–166S.
249. Walsh, A.J. *In vivo* growth factor treatment of degenerated intervertebral discs / A.J. Walsh, D.S. Bradford, J.C. Lotz // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2004. – Vol. 29(2). – P. 156–163.
250. Windhaber, R.A. Functional characterisation of glucose transport in bovine articular chondrocytes / R.A. Windhaber, R.J. Wilkins, D. Meredith // *Pflugers Arch.* – 2003. – Vol. 446(5). – P. 572–577.
251. Woertgen, C. Influence of macrophage infiltration of herniated lumbar disc tissue on outcome after lumbar disc surgery / C. Woertgen, R.D. Rothoerl, A. Brawanski // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2000. – Vol. 25(7). – P. 871–875.
252. Wuertz, K. MSC response to pH levels found in degenerating intervertebral discs / K. Wuertz, K. Godburn, J.C. Iatridis // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2009. – Vol. 379(4). – P. 824–829.
253. Zheng, C.H. Fact versus artifact: Avoiding erroneous estimates of sulfated glycosaminoglycan content using the dimethylmethylene blue colorimetric assay for tissue-engineered constructs / C.H. Zheng, M.E. Levenston // *Eur Cell Mater.* – 2015. – Vol. 29. – P. 224–236.
254. Zonal responsiveness of the human intervertebral disc to bone morphogenetic protein-2 / H. Kim, J.U. Lee, S.H. Moon et al. // *Spine (Phila Pa 1976).* – 2009. – Vol. 34(17). – P. 1834–1838.