

На правах рукописи

БФ-

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Иркутск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Семинский Игорь Жанович

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент Бывальцев Вадим Анатольевич

Официальные оппоненты:

Бодиенкова Галина Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», лаборатория иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене, заведующая

Цыбиков Намжил Нанзатович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической физиологии, заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «18» декабря 2019 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.038.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16 и на сайте <http://health-family.ru>.

Автореферат разослан «____» _____ 2019 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Гребенкина Людмила Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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). 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 (Iatridis J.C. et al., 2006), генетическая предрасположенность (Virtanen I.M. et al., 2007), 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; 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. 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 межклеточного матрикса. В частности, изучаются эффекты надсемейства трансформирующего фактора роста- β , к которым относятся костные морфогенетические белки (КМБ) и, как полагают, связаны с синтезом коллагена и протеогликанов, играя важную роль в накоплении межклеточного матрикса (Than K.D. et al., 2012). Как было показано *in vitro* и на животных моделях, на ранней стадии дегенеративного процесса КМБ 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., An H.S., 2006). Однако необходимо отметить, что закономерности изменения нутритивного транспорта МПД до сих пор остаются недостаточно изученными.

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

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, -7 и -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 его саногенеза с использованием КМБ.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные дополняют представления о влиянии микроструктуры и клеточного состава различных отделов МПД 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 52379-2005). Статистические методы исследования применялись для обработки массива полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Диффузионный транспорт в области ПЯ, ФК и замыкательной пластики МПД 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.

3. Провоспалительные цитокины оказывают негативное влияние на синтез ГАГ как неповрежденными, так и дегенерированными клетками МПД, являясь важным звеном в патогенезе прогрессирования дегенерации 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.

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 также состоит в получении исходных данных, апробации результатов исследования, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций по выполненным работам. 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 Минобрнауки России 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 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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 локальными этическими комитетами. Исследования выполнены при поддержке гранта РФ (№ 15-15-30037) и стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам (СП-2545.2018.4).

Характеристика исследованного клинического и аутопсийного материала. Забор клинического операционного материала МПД осуществляли у выразивших добровольное согласие 30 пациентов-участников исследования в возрасте от 26 до 57 лет при проведении плановых операций дискэктомии на пояснично-крестцовом отделе позвоночника. Аутопсийный материал МПД в количестве 14 образцов МПД забирали путем выделения позвоночно-двигательных сегментов на уровне L_{II}-L_{IV}. Возраст умерших варьировал от 25 до 64 лет. Причинами смерти умерших явились болезни, не связанные с дегенеративными заболеваниями МПД.

Исследование диффузионного транспорта и микроструктуры МПД. Аутопсийные блок-препараты исследовали на аппарате магнитно-резонансной томографии (МРТ) (Siemens Magnetom Essenza, Германия) в T1-, T2- и диффузионно-взвешенных (ДВ) режимах (Бывальцев и соавт., 2016). Для оценки степени дегенерации МПД по данным T2-взвешенных МР-изображений использована классификация по Pfirrmann (Pfirrmann C.W. et al., 2001). Диффузионный транспорт в МПД оценивали посредством построения и количественной оценки карт коэффициента диффузии (КД) в программе OsiriX Lite (Pixmeo, Швейцария).

Для морфометрического анализа выделяли фрагменты ткани МПД размером 0,5 см³ в срединной сагиттальной плоскости с сохранением целостности замыкательных пластинок: область ПЯ, передний и задний отделы ФК. Фрагменты ткани фиксировали в забуференном растворе 10 % нейтрального формалина и окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические препараты сканировали на микроскопе (Axio Vert.A и AxioCam 506 color, Carl Zeiss, Германия), количественную оценку клеток проводили в программе "Fiji" (НИН, США), плотность клеток выражали в числе клеток/мм³.

Для иммуногистохимического анализа фрагменты ткани фиксировали 4 % раствором параформальдегида (Sigma, США). Основные компоненты внеклеточного матрикса МПД определяли с помощью панели первичных IgG антител (Abcam, США) к коллагенам I, II, X, XI α 2 типов и агрекану, которые окрашивали вторичными IgG антителами, мечеными Alexa Fluor 594 (Abcam, США). Ядра окрашивали Hoechst 33342 (ThermoFisher, США). Препараты, заключенные в Prolong gold (Life Sciences, США), сканировали на лазерном конфокальном микроскопе "LSM-710" (Carl Zeiss, Германия). Полученные Z-стеки анализировали с помощью программ "Imaris 7.2.3" (Bitplane AG) и "ZEN" (Carl Zeiss, Германия). Для просвечивающей электронной микроскопии

фрагменты МПД фиксировали, заливали в эпоксидную смолу, нарезали на ультрамикротоме и исследовали на электронном микроскопе Leo 906 E (Carl Zeiss, Германия).

Получение и культивирование клеток МПД. Объектом исследования служили клеточные культуры, полученные из ФК и ПЯ неповрежденного и дегенерированного МПД человека. Выделение клеток проводили методом ферментативной дезагрегации. Клеточный осадок смешивали с питательной средой Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 (DMEM/F12), дополненной 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и 1 % раствором пенициллина и стрептомицина, помещали в культуральный флакон и культивировали в монослое при температуре 37 °С, 95 % влажности, 5 % содержания CO₂. Замену среды осуществляли каждые двое суток. При заполнении слоем культуры 90 % поверхности флакона, клетки отделяли с помощью 0,25 % раствора трипсина (GE Healthcare Life Sciences, США) и дважды пересевали до начала эксперимента.

Культивирование клеток линии ТНР-1. Моноцитоподобные клетки линии ТНР-1 были получены из периферической крови годовалого ребенка с острой моноцитарной лейкемией (АТСС, США). Клетки размораживали на водяной бане и культивировали в среде RPMI-1640 (АТСС, США) при температуре 37 °С, 95 % влажности, 5 % CO₂. Накануне опыта для стимуляции клеточной дифференцировки клетки линии ТНР-1 в количестве $2 \cdot 10^5$ вносили в лунки 12-луночного планшета и культивировали с добавлением 100 нМ форбол-12-миристан-13-ацетата (Sigma, США) в течение 72 ч (Park J.J. et al., 2016). Активированные макрофагоподобные клетки линии ТНР-1 (аТНР-1) адгезировались к поверхности культуральной лунки.

Исследование влияния провоспалительных цитокинов на клетки МПД. Исследование влияния провоспалительных цитокинов проводили в условиях трехмерного культивирования клеток МПД в альгинатных микросферах, которые имели диаметр 2 мм и объем 10 мкл. Микросферы с клетками ПЯ или ФК культивировали в лунках 12-луночного планшета в среде DMEM/F-12, дополненной 10 % ЭТС и 1 % раствором пенициллина и стрептомицина в течение 7 суток до начала эксперимента. Сокультивирование клеток МПД и аТНР-1 проводили с использованием 12-мм трансвеллов с размером пор 0,4 мкм, установленных в лунки плоскодонного планшета. В лунку с аТНР-1 помещали трансвелл и вносили альгинатные микросферы с клетками ПЯ или ФК в концентрации $2 \cdot 10^5$ /мл. Трансвеллы предотвращают фагоцитоз, однако допускают паракринные взаимодействия через поры путем свободной циркуляции жидкости. Исследовали группы сокультивирования неповрежденных и дегенерированных ПЯ и ФК с аТНР-1 клетками, в качестве контроля использовали соответствующие монокультуры. Клетки инкубировали в течение 48 ч, затем надосадочную жидкость и клетки собирали и проводили анализ уровня секреции цитокинов, оценку нутритивного статуса, синтетической активности и морфологию клеток МПД.

Исследование влияния костных морфогенетических белков на клетки МПД. 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, 3) с добавлением КМБ-7 100 нг/мл, 4) 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.

Мультиплексный анализ уровня секреции цитокинов при совместном культивировании клеток линии ТНР-1 и клеток МПД человека. Мультиплексный анализ содержания ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-12p70 проводили методом проточной цитометрии с использованием микросфер на цитофлуориметре FACS Aria II (BD, США).

Оценка пролиферативной активности клеток МПД при воздействии КМБ. С целью анализа пролиферативной активности клеток МПД при воздействии КМБ-2, -7, -14 клеточные культуры ПЯ и ФК культивировали в соответствии с группами эксперимента в чашках Петри диаметром 35 мм с дном из покровного стекла 10 мм (MatTec, США). Проводилась ежедневная оценка состояния клеточных культур методом фазово-контрастной микроскопии (Axio, Carl Zeiss, Германия). Цифровые изображения получали путем фотографирования на увеличении 200x 6 полей зрения каждой культуральной чашки в течение 4 дней. Анализ цифровых изображений проводили в программе FIJI (NIH, США) с использованием плагина для подсчета клеток.

Оценка жизнеспособности клеток. Подсчет количества живых клеток в культуре производили с использованием теста с трипановым синим 0,4 % (ThermoFisher Scientific, США). Анализ показал высокий процент живых клеток во всех группах с общим средним показателем $94,4 \pm 4,2$ %. Данные подсчета клеток использовались для расчета скорости потребления глюкозы и продукции лактата, метаболической активности и продукции ГАГ клетками МПД.

Исследование потребления глюкозы и продукции лактата. Содержание глюкозы определяли энзиматическим методом Далквиста. Концентрацию хромогена определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Для определения количества лактата в среде применяли энзиматический метод Хохорста с модификациями. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 340 нм.

Оценка метаболической активности клеток. Редокс-индикатор аламар синий (Alamarblue, Invitrogen, США) добавляли в среду с клетками в соотношении 1:10, инкубировали в течение 2 ч. После этого проводили измерение оптической плотности восстановленной формы индикатора в среде при длине волны 570-600 нм. Показатели теста нормализовали с учетом количества клеток в культуре.

Оценка продукции ГАГ. Количество сульфатированных ГАГ, наиболее часто встречающихся в составе протеогликанов МПД, определяли с использованием тест-системы, основанной на реакции с 1,9-диметилметиленовым голубым, с модификациями. Измерение абсорбции производили на планшетном спектрофлуориметре при длине волны 525 нм.

Иммуноцитохимическое исследование клеток МПД. Окраску на F-актиновые микрофиламенты цитоскелета проводили с помощью красителя Alexa Fluor® 633 phalloidin, окраску ядер клеток – 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (Life Technologies, США). Окрашенные препараты 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). Волнометрические 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, цитоплазмы, ядра, ядерно-цитоплазматического отношения, коэффициента сферичности ядра.

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 %). Используются критерии t Стьюдента, r_{χ^2} для количественных и биноминальных 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).

Результаты исследования и их обсуждение

Комплексный анализ диффузионного транспорта и микроструктуры МПД

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 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 ДВИ МРТ. Степень дегенерации исследованных МПД на основе оценки T2-изображений имела значимую корреляцию с КД ПЯ ($r = -0,69$, $p < 0,05$). Уровень исследованных МПД, в отличие от степени их 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 (Таблица 1), 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.

Таблица 1 – Значения КД и количество клеток в разных отделах МПД ($M \pm SD$)

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

Морфологическое исследование материала позволило выявить структурные изменения, характерные для дегенерации МПД: в качестве иллюстративного примера приведено гистологическое исследование МПД пациента 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» (Рисунок 1).

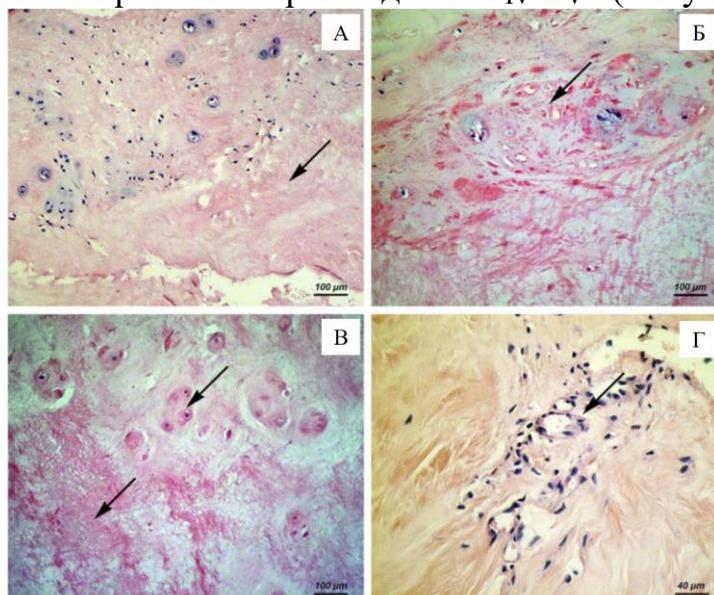


Рисунок 1 – Пациент 39 лет, гистологическое исследование межпозвонкового диска L_{IV}-L_V. Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия. А) Некроз ткани ПЯ; Б) Дистрофические изменения и коагуляционный некроз хондроцитов; В) Изогруппы хондроцитов с дистрофическими изменениями, разрушение матрикса; Г) Задняя продольная связка с пролиферацией капилляров и фибробластов, продуктивное воспаление

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 1, А-В). При этом в задней продольной связке выявлены признаки активного продуктивного воспаления: пролиферация капилляров и фибробластов (Рисунок 1, Г).

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 (мкм³) на 1x10⁶ мкм³ ткани, представлены на Рисунке 2.

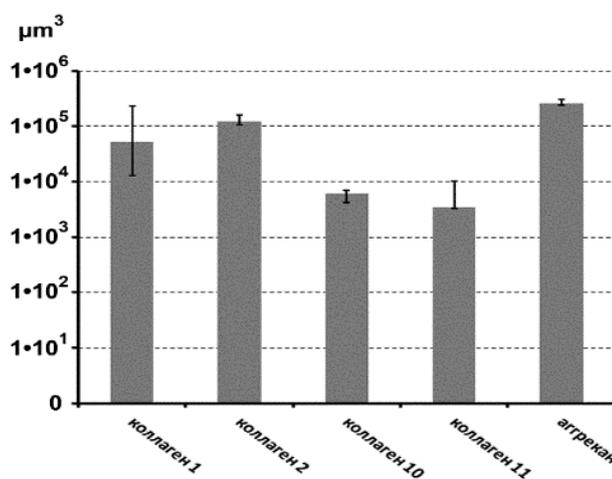


Рисунок 2 – Спектр коллагенов и агрекана в исследуемых тканях дегенерированного МПД: объемы анализируемых областей МПД, занимаемых флуоресцентным сигналом (мкм³) на 1x10⁶ мкм³ ткани

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. В 2 образцах МПД с умеренной степенью дегенерации (III степень по Pfirmann, 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. Это позволило определить в ткани МПД отдельные, хорошо сохранные хондроциты, среди которых располагались многочисленные, разнообразно ориентированные нити коллагена с разной степенью структурной организации. 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.

Исследование влияния провоспалительных цитокинов на клетки МПД

Анализ уровня секреции цитокинов при сокультивировании клеток линии ТНР-1 и клеток МПД человека. При исследовании уровня секреции цитокинов клетками неповрежденного и дегенерированного МПД выявлено, что клетки неповрежденного ПЯ секретируют значимо больше ИЛ-6 по сравнению с дегенерированными ($11,36 \pm 3,58$ 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, $p < 0,05$). При сравнении групп клеток неповрежденного и дегенерированного ФК выявлены статистически значимые различия в уровне секреции ИЛ-12p70, ИЛ-10 и ИЛ-8 ($p < 0,05$ во всех группах). Анализ также показал повышенный уровень продукции ФНО- α в группах клеток ПЯ и ФК дегенерированного МПД по сравнению с таковыми неповрежденного, однако данные различия не оказались статистически значимыми ($p = 0,33$). Установлено статистически значимое увеличение уровня всех исследуемых цитокинов в среде активированных клеток ТНР-1 под влиянием по сравнению со спонтанным уровнем их секреции клетками ТНР-1 ($p < 0,05$).

Данные мультиплексного анализа показали достоверное увеличение уровня ИЛ-1 β , ИЛ-8 во всех группах сокультивирования клеток МПД и аТНР-1 клеток, а снижение уровня ИЛ-6 в группе сокультивирования неповрежденных клеток ПЯ с активированными клетками ТНР-1 по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$ во всех группах) (Таблица 2). Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что сокультивирование клеток МПД в трехмерной культуре с аТНР-1 является состоятельной *in vitro* моделью для изучения влияний комплекса провоспалительных цитокинов на клетки МПД, что соответствует целям эксперимента.

Таблица 2. Сравнительный анализ уровня цитокинов в группах клеток неповрежденных и дегенерированных клеток ПЯ и ФК при сокультивировании с аТНР-1 (пг/мл)

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

*– $p < 0,05$ группа сокультивирования с аТНР-1 клетками в сравнении с соответствующей группой контроля. Для расчета критерия χ^2 использован post-hoc Mann-Whitney U тест.

Исследование продукции лактата клетками МПД под воздействием провоспалительных цитокинов. При анализе продукции лактата клетками неповрежденного МПД выявлено, что клетки ФК выделяют больше лактата, чем клетки ПЯ ($p < 0.05$). В дегенерированном МПД уровень продукции лактата был снижен и оказался одинаковым для обоих типов клеток. В группах сокультивирования неповрежденных клеток ПЯ и ФК с аТНР-1 клетками выявлено статистически значимое увеличение уровня продукции лактата клетками МПД по сравнению с соответствующим контролем (Рисунок 3, А). В группах сокультивирования клеток дегенерированных ПЯ и ФК с аТНР-1 клетками по сравнению с соответствующими монокультурами также выявлено статистически значимое увеличение по уровню продукции лактата ($p < 0.05$).

Исследование синтетической активности клеток МПД под воздействием провоспалительных цитокинов. Тест показал снижение уровня продукции ГАГ в 1,4 раза клетками дегенерированного ПЯ по сравнению с клетками неповрежденного ($p < 0,05$), а уровень продукции ГАГ клетками дегенерированного ФК также был достоверно ниже, чем неповрежденного ФК ($p < 0,05$). Выявлено, что неповрежденные клетки ПЯ синтезируют достоверно больше ГАГ, чем неповрежденные клетки ФК, что соответствует распределению ГАГ в нативном МПД. При дегенерации МПД синтез ГАГ снижался обоими типами клеток, при этом значимых различий в уровне продукции ГАГ между ними уже не наблюдалось. Установлено статистически значимое повсеместное снижение уровня продукции ГАГ в группе сокультивирования клеток неповрежденных и дегенерированных ПЯ и ФК по сравнению с соответствующими им группами контроля (во всех группах сравнения $p < 0,05$) (Рисунок 3, Б). Таким образом, провоспалительные цитокины снижают синтез ГАГ в 1,7 раз неповрежденными и в 1,8 раз дегенерированными клетками МПД. Выявленное снижение уровня продукции ГАГ клетками ФК под воздействием провоспалительных цитокинов может вносить значительный вклад в изменение баланса синтеза и распада межклеточного матрикса и способствовать прогрессированию макроскопически наблюдаемых признаков дегенерации.

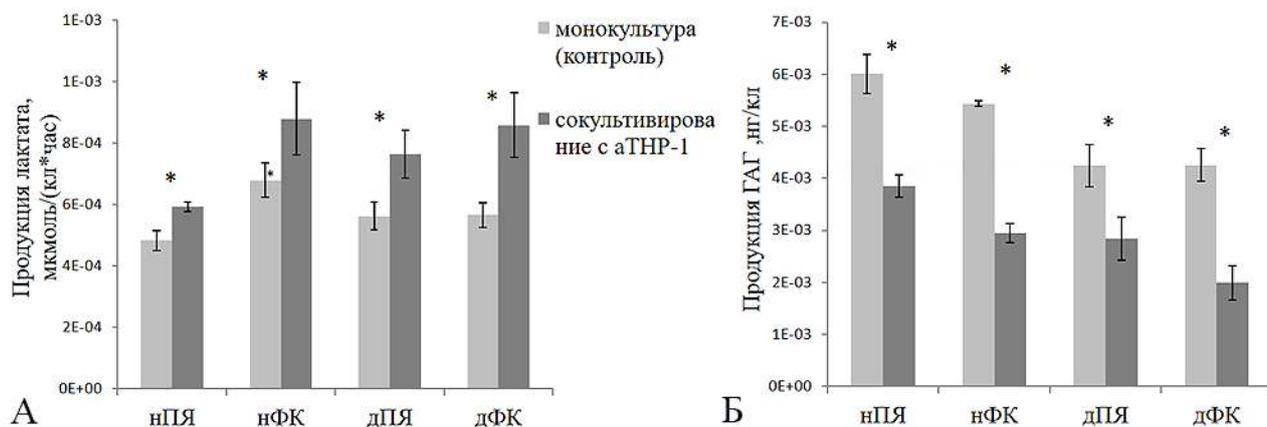


Рисунок 3 – А) Сравнительный анализ уровня продукции лактата (А) и ГАГ (Б) в группах неповрежденных и дегенерированных клеток МПД при сокультивировании с активированными клетками ТНР-1 (аТНР-1) и в контроле.* – $p < 0.05$

Иммуноцитохимическое исследование клеток МПД 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. При анализе объемов клеток, цитоплазмы, ядра, ядерно-цитоплазматического отношения и коэффициента сферичности ядра при сокультивировании клеток ПЯ и ФК с аТНР-1 клетками выявлено, что в кластерах клеток при трехмерном культивировании наблюдаются признаки, характерные для дегенерации МПД человека (Рисунок 4). Изменение ядерно-цитоплазматических отношений является важным фактором адаптации клеток МПД и реакции на неблагоприятные воздействия.

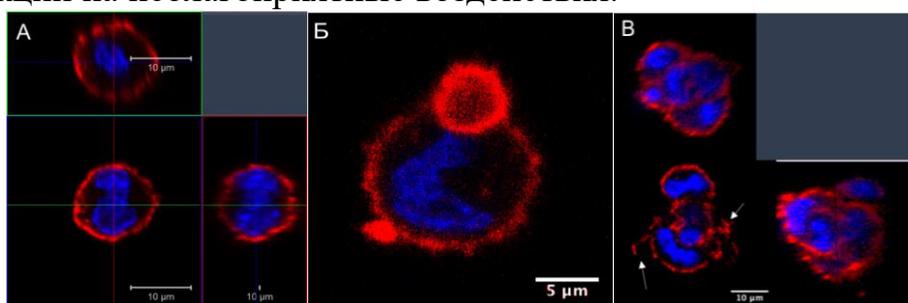


Рисунок 4 – Морфологические особенности неповрежденных клеток ФК в трехмерной культуре. А) Ортогональная проекция единичной клетки ФК. Б) Конфокальный срез демонстрирует два отпочковывающихся участка клетки ФК. В) Конгломерат клеток ФК. Определяются участки с пальцевидными выпячиваниями (стрелки)

Исследование влияния КМБ-2, -7 и -14 на клетки МПД

Исследование пролиферативной активности клеток МПД при воздействии КМБ. Для учета разницы в исходном количестве клеток МПД при сравнении пролиферации клеточных популяций данные нормализованы к изначальной плотности засеивания культур клеток. Рост популяции клеток рассчитан с учетом 3 дней для культур клеток ФК и 5 дней для клеток ПЯ (Рисунок 5).

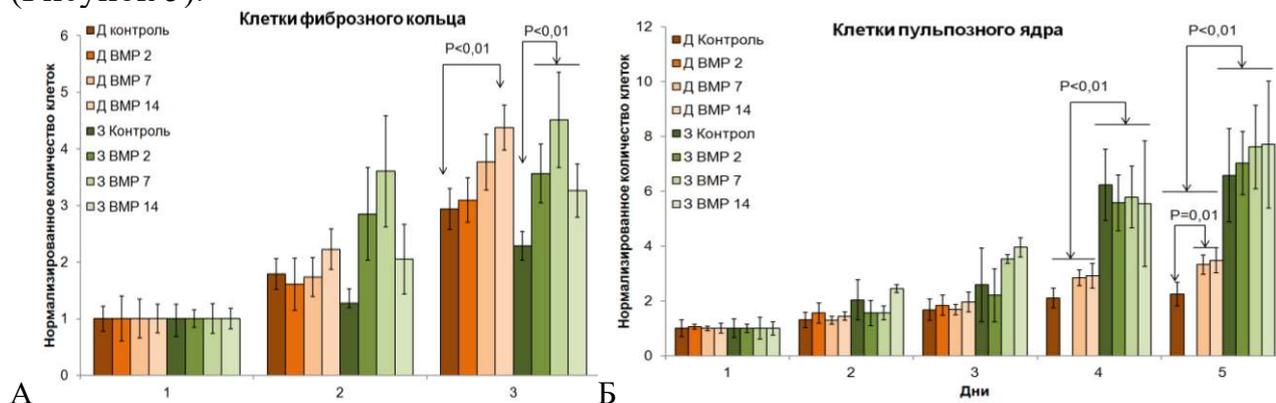


Рисунок 5 – Сравнение нормализованных значений динамики количества неповрежденных (Н) и дегенерированных (Д) клеток: А — ФК; Б — ПЯ; значения представлены как $M \pm SD$

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 со неповрежденными клетками ПЯ ($p < 0.05$). 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 6). В группе дегенерированных клеток ПЯ отмечено увеличение количества клеток под действием КМБ-7 и КМБ-14 ($p = 0,01$). 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.

Оценка нутритивного статуса и метаболизма клеток 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, культивируемых с добавлением КМБ-2, -7 или -14 ($p = 0,43$), а также между группами клеток ПЯ и ФК ($p = 0,5$). 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. При проведении сравнительного анализа продукции лактата клетками 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 6). Таким образом, эксперимент с определением концентрации лактата показал, что на его уровень оказывает влияние статус дегенерации клеток, а не воздействие исследуемых КМБ.

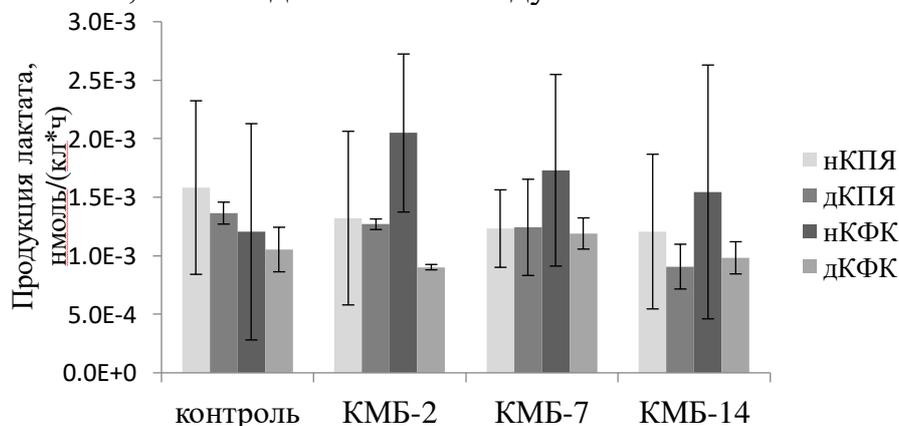


Рисунок 6 – Сравнительный анализ продукции лактата в группах неповрежденных (н) и дегенерированных (д) клеток ПЯ (КПЯ) и ФК (КФК) при воздействии КМБ-2, -7 и -14

Исследование синтетической активности клеток МПД при воздействии КМБ. 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 ($p < 0,001$). 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 ($p = 0,05$). 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 ($p=0,006$). Выявлено отсутствие статистически значимого влияния КМБ-2, -7 или -14 на уровень продукции ГАГ клетками дегенерированного ПЯ или ФК по сравнению с контрольной группой ($p = 0,2$, $p=0,5$ соответственно). 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.

Иммуоцитохимическое исследование клеток МПД при воздействии КМБ. При 100%-ной конfluence клетки ФК и ПЯ имели схожую веретенообразную форму с продольной ориентацией либо радиальной – к центрам скопления клеток (Рисунок 7). Ядра клеток ровные овальные, размером от 15 до 30 мкм в диаметре. Таким образом, при проведении иммуоцитохимического исследования с окраской на актиновый цитоскелет клетки как неповрежденных, так и дегенерированных ПЯ и ФК имели схожие морфологические формы и не проявляли очевидных различий в присутствии КМБ.

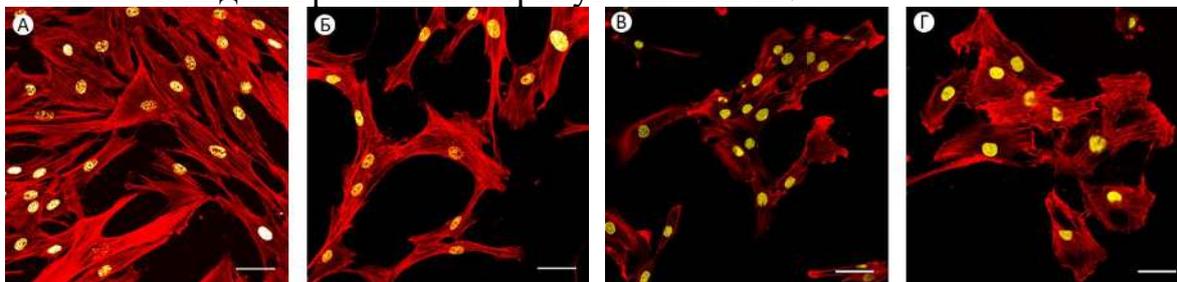


Рисунок 7 – Иммуоцитохимическая окраска клеток ФК и ПЯ неповрежденного (А и Б соответственно) и дегенерированного (В и Г соответственно) МПД, фиксированных на 4-й день культивирования: окраска на F-актин (Alexa Fluor 633 phalloidin, отмечено красным цветом) и на ядерную ДНК (DAPI, отмечено желтым цветом); изображения сделаны с использованием лазерной сканирующей микроскопии (бар – 50 мкм)

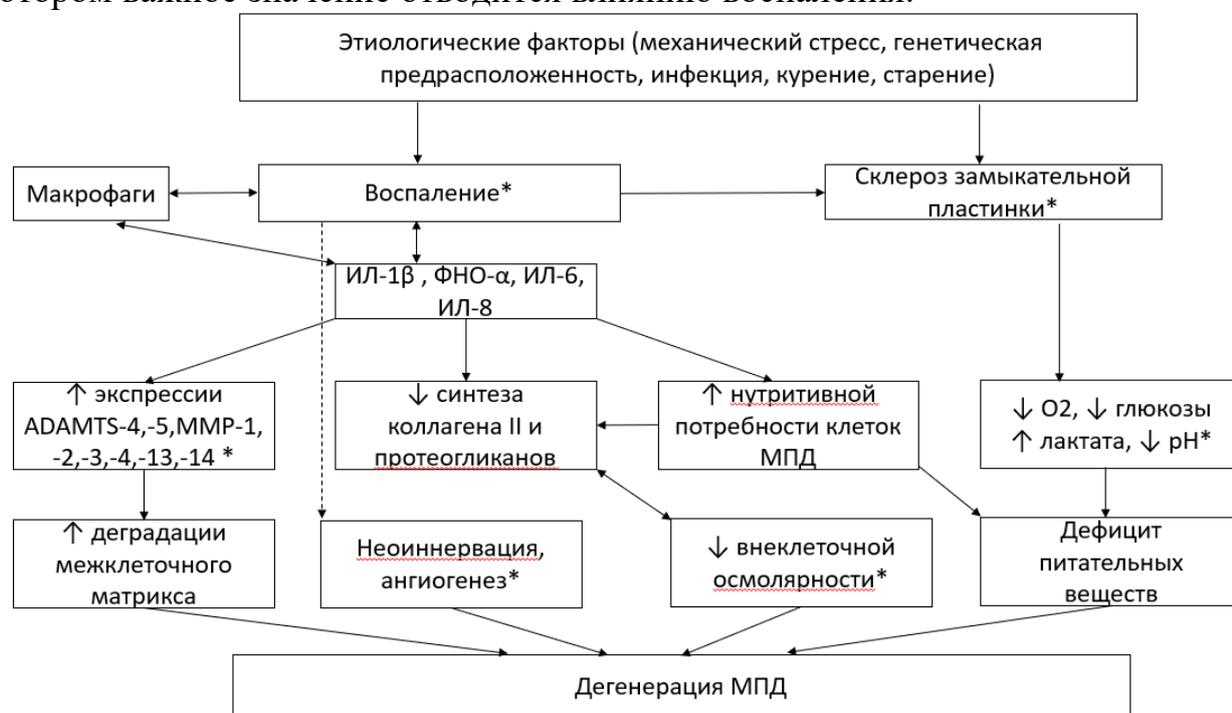
Полученные экспериментальные данные представляют новые сведения о влиянии КМБ на метаболизм клеток МПД и уточняют современные представления о патогенезе дегенеративного процесса МПД. Показано, что помимо изменения биосинтетической активности, КМБ протеины не оказывают значительного влияния на потребление глюкозы клеток ФК и ПЯ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное нами исследование показало, 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. Развивающиеся морфологические изменения в МПД сопровождаются изменением состава межклеточного матрикса и спектром синтезируемого коллагена. В тканях диска с КД ПЯ менее $15 \cdot 10^{-4}$ мм²/с, помимо агрекана, коллагенов I и II типов были выявлены коллагены X и XI типов.

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 pH в нативном МПД, тем самым ухудшая активность и жизнеспособность клеток.

Нами предложена концептуальная схема патогенеза дегенерации МПД (Рисунок 8), который представляет собой сложный стадийный процесс, в котором важное значение отводится влиянию воспаления.



* - по данным литературы

Рисунок 8 – 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. 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. Отсутствие влияния КМБ-7 и -14 на нутритивный статус клеток МПД и в то же время их стимулирующий эффект на синтез ГАГ как основного компонента межклеточного матрикса МПД, запускают механизмы саногенеза, что может способствовать в дальнейшем восстановлению структуры и функции МПД. Это позволяет рассматривать КМБ как перспективную терапию на ранних стадиях дегенерации МПД или поддерживающую терапию совместно с имплантацией клеток (Рисунок 9).

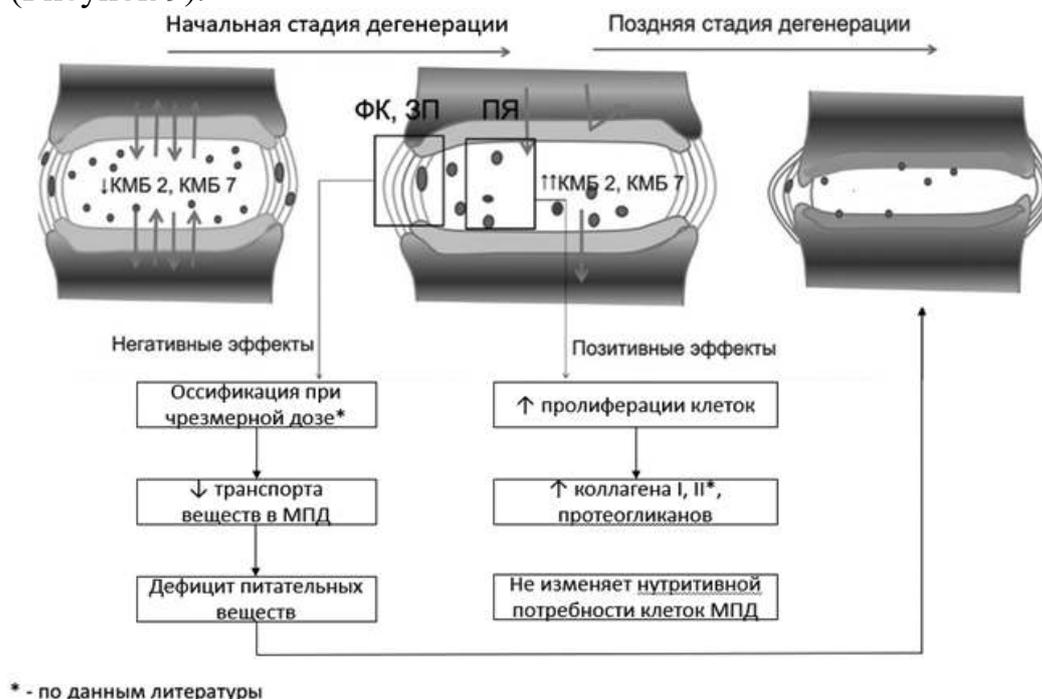


Рисунок 9 – Схема саногенеза дегенерации МПД с использованием костных морфогенетических белков

Таким образом, полученные результаты раскрывают некоторые звенья патогенеза дегенерации МПД и позволяют целенаправленно влиять на механизмы саногенеза при его репарации. Восстановление способности диска синтезировать полноценный внеклеточный матрикс, богатый протеогликанами и коллагенами является ключевой задачей в коррекции и профилактике дегенеративно-дистрофических процессов в МПД.

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 раз 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий ВАК Минобрнауки РФ

1. Роль матричных металлопротеиназ и противовоспалительных цитокинов в современных подходах к регенерации межпозвонкового диска / **Л.А. Бардонова**, Е.Г. Белых, И.А. Степанов, В.А. Бывальцев // Тихоокеанский медицинский журнал. – №4 – 2015. – С. 21–25.
2. **Л.А. Бардонова**. Исследование метаболической активности и синтеза протеогликанов клетками межпозвонкового диска под воздействием костного морфогенетического белка 2 в эксперименте / **Л.А. Бардонова**, Е.Г. Белых, В.А. Бывальцев // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2016. – Т. 1, №. 4. – С. 99–103.
3. Использование стволовых клеток в терапии дегенерации межпозвонкового диска / В.А. Бывальцев, И.А. Степанов, **Л.А. Бардонова**, Е.Г. Белых //

Вестник Российской академии медицинских наук. – 2016. – Т. 71, № 5. – С. 359–366 (**Scopus**).

4. Эмбриогенез и регенерация межпозвонкового диска (обзор) // И.А. Степанов, **Л.А. Бардонова**, Е.Г. Белых, В.А. Бывальцев. Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9, № 3. – С. 151–161 (**Web of Science, Scopus**).
5. Комплексный анализ диффузионного транспорта и микроструктуры межпозвонкового диска / В.А. Бывальцев, С.И. Колесников, Е.Г. Белых, И.А. Степанов, А.А. Калинин, **Л.А. Бардонова** [и др.] // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2017. – №8. – С. 124-129 (**Web of Science, Scopus**).
6. Пролиферативная активность неповрежденных и дегенерированных клеток межпозвонкового диска *in vitro* при воздействии костных морфогенетических протеинов: возможности для клеточной терапии / **Л.А. Бардонова**, Е.Г. Белых, В.А. Бывальцев [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 76–82 (**Web of Science, Scopus**).
7. Development of an *in vitro* model of inflammatory cytokine influences on intervertebral disk cells in 3D cell culture using activated macrophage-like thp-1 cells / V.A. Byvaltsev, S.I. Kolesnikov, L.A. Bardonova [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018. – Vol.166 (1). – P. 151–154 (**Web of Science, Scopus**).
8. Assessment of lactate production and proteoglycans synthesis by the intact and degenerated intervertebral disc cells under the influence of activated macrophages: an *in vitro* study / V.A. Byvaltsev, S.I. Kolesnikov, L.A. Bardonova [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018. – Vol. 166 (1). – P. 170–173 (**Web of Science, Scopus**).

Публикации в иных изданиях:

9. 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. 870–877 (**Web of Science, Scopus**).
10. A mathematical model of the effect of bone morphogenetic proteins on proliferation of intervertebral disc cells *in vitro* / **L.A. Bardonova**, E.G. Belykh, V.A. Byvaltsev [et al.] // The New Armenian Medical Journal – Vol.11, № 1. – P. 55–60 (**Web of Science, Scopus**).
11. Energy Supply and Demand in the Intervertebral Disc // **L.A. Bardonova**, O. Sheikh, V.A. Sorokovikov [et al.] // Coluna/Columna. – 2018. – Vol. 17, № 3. – P. 237–239 (**Scopus**).
12. Bone morphogenetic proteins' influence on intervertebral disc cells' nutrient consumption and protein production: implications for regenerative therapy / M.B. Giers, **L.A. Bardonova**, E.G. Belykh [et al.] // Tissue engineering, Meeting Abstract, Part A. – Dec 2016 – Vol. 22, Suppl 1. – P. S84–S85 (**Scopus**).
13. Дегенерация межпозвонкового диска и возможности тканевой инженерии: обзор литературы / В.А. Бывальцев, И.А. Степанов, **Л.А. Бардонова**, Е.Г. Белых // Хирургия позвоночника – 2017. – Т. 14, № 1. – С. 60–67.
14. **Бардонова Л.А.** Влияние костных морфогенетических белков на потребление питательных веществ и синтез протеогликанов в

- межпозвоночном диске в аспекте регенеративной терапии / **Л.А. Бардонова**, Е.Г. Белых, В.А. Бывальцев // Сборник тезисов XXIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии-2017» (13-14 апреля 2017) – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2017. – С. 27–28.
15. Математическая модель влияния костных морфогенетических белков на пролиферацию клеток межпозвоночного диска в эксперименте / **Л.А. Бардонова**, Е.Г. Белых, В.А. Бывальцев [и др.] // Фундаментальные и прикладные аспекты поражений и повреждений позвоночника: материалы VIII съезда Межрегиональной Ассоциации хирургов-вертебрологов России с международным участием и IV съезда дорожных нейрохирургов (25-26 мая 2017) / под ред. В.А. Сорокиковой, А.О. Гущи. – Иркутск : ИНИЦХТ, 2017. – С. 34–35.
16. **Бардонова, Л.А.** Влияние провоспалительных цитокинов на потребление питательных веществ и синтез протеогликанов в межпозвоночном диске в эксперименте // **Л.А. Бардонова**, В.А. Бывальцев // Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2018». – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2018. – С.30.
17. Bone morphogenetic proteins influence on intervertebral disc cells activity / **L.A. Bardonova**, M.B. Giers E.G. Belykh [et al.] // The 5th Russian-Japanese Neurosurgical Symposium, Kazan, 22-25 June / under the editorship Professor Natalia Ivanova, Professor Victor Olyushin, Dr Margarita Khristoforova – Kazan, 2016. – P. 45.
18. Bone morphogenetic proteins' influence on intervertebral disc cell proliferation in vitro / **L.A. Bardonova**, E.G. Belykh, M.C. Preul [et al.]// Materials of 4th Annual Meeting of the Mongolian Neuroscience Society «Multidisciplinary Brain Science 2017». – Ulaanbaatar, Mongolia – P. 3.
19. Nutrient consumption and protein production in degenerated intervertebral disc cells under bone morphogenetic proteins influence / **L. Bardonova**, M. Giers, E. Belykh [et al.] // Abstract book (electronic) of European Association of Neurological Surgeons, – 2017. – Abstract #A-907-0010-01328.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- aTNP-1 – активированные макрофагоподобные клетки линии TNP-1
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
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
ФК – фиброзное кольцо
ФНО- α – фактор некроза опухоли- α
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12) – модифицированная Дульбекко среда Игла в сочетании со средой Хэма
М – среднее значение
SD – стандартное отклонение