

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 616.721.1-003.93-071:512.398

Л.А. Бардонова², Е.Г. Белых¹, В.А. Бывальцев^{1, 2, 3, 4}

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И СИНТЕЗА ПРОТЕОГЛИКАНОВ КЛЕТКАМИ МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КОСТНОГО МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА 2 В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹ ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, Россия
² ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иркутск, Россия
³ НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский ОАО «РЖД», Иркутск, Россия
⁴ ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Иркутск, Россия

Проведено изучение продукции протеогликанов клетками межпозвонкового диска под влиянием костного морфогенетического белка 2 в эксперименте. Эксперимент выполнялся на клеточных культурах, полученных из клеток фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска человека, выращенных с добавлением костного морфогенетического белка 2. Нами исследована жизнеспособность, метаболическая активность и экспрессия протеогликанов. Полученные результаты свидетельствуют об анаболическом эффекте костного морфогенетического белка 2 по отношению к клеткам межпозвонкового диска.

Ключевые слова: межпозвонковый диск, дегенерация, костный морфогенетический белок, протеогликаны

BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 INFLUENCE ON METABOLIC ACTIVITY AND PROTEOGLYCAN SYNTHESIS BY INTERVERTEBRAL DISC CELLS

L.A. Bardonova², E.G. Belykh², V.A. Byvaltsev^{1, 2, 3, 4}

¹ Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia
² Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia
³ Railway Clinical Hospital at the Irkutsk-Passazhirskiy Railway Station of Russian Railways Ltd., Irkutsk, Russia
⁴ Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk, Russia

Modern therapeutic strategies for intervertebral disc repair mainly focus on targeting molecular pathways of extracellular matrix degeneration. Anabolic strategies for regeneration are aimed to increase production of major extracellular molecules. Members of TGF- β superfamily proteins, particularly the bone morphogenetic proteins (BMP) have a high regenerative potential regarding the mesenchymal cells.

The goal of this study is to study production of proteoglycans by the intervertebral disc cells under the influence of bone morphogenetic protein 2.

Material and methods. The experiment was carried out on the cell cultures derived from the annulus fibrosis cells and nucleus pulposus cells of the human intervertebral disc. We studied cell livability, metabolic activity and proteoglycan expression. Cell livability was assessed using the trypan blue staining. Alamar blue test was used for the estimation of metabolic activity. Amount of sulfated glycosaminoglycans was assessed using the assay based on the reaction with 1,9-Dimethylmethylene Blue.

Results. Cultivation with bone morphogenetic protein 2 in different concentrations did not decrease livability of the cells. Study cell cultures with application of bone morphogenetic protein 2 in different concentrations showed significant increase in metabolic activity and proteoglycan synthesis by the annulus fibrosis cells. Despite the relative increase in the number of the nucleus pulposus cells treated with the bone morphogenetic protein 2, the differences in metabolic and synthetic activity compared with control group was not significant.

Conclusion. The bone morphogenetic protein 2 has an anabolic effect towards the intervertebral disc cells, particularly in the production of proteoglycans by the annulus fibrosis cells.

Key words: intervertebral disc, degeneration, bone morphogenetic protein, proteoglycans

Этиология патологических процессов дегенерации МПД является мультифакториальной. При дегенерации изменяется не только структура МПД, но и его клеточный состав. Основными причинными факторами являются механическая травма, наруше-

ние питания МПД и генетическая предрасположенность [15].

Важным биохимическим компонентом МПД являются протеогликаны – молекулы, имеющие в своем составе волокнистый центральный белок с ковалент-

но присоединёнными к нему гликозаминогликанами (ГАГ). Выделяют разновидности ГАГ: гиалуроновая кислота, дерматансульфат, хондроитинсульфат, гепарансульфат, кератансульфат и гепарин (гепаринсульфат). Чаще всего встречаются сульфатированные ГАГ – хондроитинсульфат (хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат) и кератансульфат. Функцией хондроитинсульфата является создание имбибиционного давления, которое в межпозвоночном диске удерживает большое количество молекул воды. Кератансульфаты формируют поперечные связи, усиливая пространственную стабилизацию, обеспечивает распределение отрицательно заряженных концевых групп ГАГ, необходимых для транспорта метаболитов [9, 16].

Агреканы являются основными протеогликанами пульпозного ядра, образующими макромолекулярные агрегаты с гиалуроновой кислотой и окруженными сетью коллагеновых волокон II типа. Эти макромолекулярные структуры удерживают воду в МПД, обуславливая формирование внутреннего гидростатического давления, которое противостоит сжимающей осевой нагрузке [14, 15].

При дегенерации индивидуальная химическая структура протеогликанов не изменяется, но меняется их количество, взаимная ориентация. Повышается отношение кератинсульфатов к хондроитинсульфатам, снижается их связь с коллагеном, уменьшается эластичность и сила натяжения диска [9]. Уменьшение содержания агреканов в пульпозном ядре приводит к снижению гидратации с нарушением механической функции МПД в целом. Одним из следствий дегенерации является снижение высоты МПД, что вызывает перераспределение осевой нагрузки позвоночника на другие опорные элементы и возникновение компрессии окружающих структур. Прогрессирующее повреждение целостности протеогликановой системы ведет к снижению гидратированности ткани пульпозного ядра и нарушению нутритивного транспорта. В дальнейшем это приводит к снижению количества жизнеспособных клеток и дальнейшему нарушению транспорта веществ в МПД [8, 10].

С позиции перспектив регенерации МПД получили повышенный интерес исследования экспрессий молекул, которые меняют баланс катаболизма и анаболизма внеклеточного матрикса [2, 10]. Один из подходов к регенерации МПД заключается в активации синтеза основных молекул внеклеточного матрикса пульпозного ядра (коллаген 2, протеогликаны, агрекан) клетками МПД. Как было показано *in vitro* и на животных моделях, терапевтические подходы с использованием факторов роста могут вызвать эндогенную регенерацию МПД [7]. Это связано с недавним открытием клеток-предшественников в дегенерированных МПД человека. Факторы роста надсемейства TGF- β , в частности морфогенетические протеины кости обладают регенераторным потенциалом в отношении клеток мезенхимального ряда [1, 11]. Один из представителей данного семейства, костный морфогенетический белок 2, уже одобрен для клинического использования в ряде стран. Изуче-

ние влияния данного цитокина на биосинтетическую активность клеток пульпозного ядра (КПЯ) и клеток фиброзного кольца (КФК) является актуальным для оценки потенциальных патофизиологических механизмов регенерации МПД [3].

Целью настоящего исследования явилась изучение продукции протеогликанов клетками межпозвоночного диска под влиянием костного морфогенетического протеина 2 в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента. Эксперимент выполнялся на клеточных культурах, полученных из КФК и КПЯ человека (Sciencell Research Laboratories, Карлсбад, Калифорния, США). Клетки размораживали на водяной бане 37 °С и культивировали в монослое в стерильных флаконах с площадью поверхности 25 см² в питательной среде Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (ThermoFisher), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой и 1% раствора пенициллина и стрептомицина при температуре 37 °С, 95% влажности при 5% содержании CO₂. При заполнении непрерывным слоем культуры 90 % поверхности флакона клетки отделяли с помощью трипсина по стандартной методике [13] и пересевали в соотношении 1:4. После первого пассажа клеточные линии КПЯ и КФК разделены на 3 группы каждая: 1) клетки, выращенные в контрольных средах, $n = 3$; 2) среда с добавлением КМБ 2 в концентрации 200 нг/мл, $n = 3$; 3) клетки с добавлением КМБ 2 в концентрации 100 нг/мл, $n = 3$. Замена питательных сред производилась на 2-й и 4-й день. Забор материала для анализа производили на 5-й день культивирования.

Оценка жизнеспособности клеток. Оценку жизнеспособности и подсчет количества клеток 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 [12]. Подсчет числа окрашенных и неокрашенных клеток проводился с помощью автоматического счетчика клеток (Countess II FL Automated Cell Counter, ThermoFisher Scientific, США).

Оценка метаболической активности клеток. Для оценки активности метаболических процессов применяли тест-систему с индикатором аламар синий (Alamarblue, Invitrogen, США). Редокс-индикатор тест-системы 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 96-луночные планшеты и производили измерение интенсивности флуоресценции восстановленной формы индикатора в среде на планшетном спектрофлуориметре (Tecan Infinite 200Pro, Switzerland) при возбуждении длиной волны 540–570 нм и считывания эмиссии в диапазоне 580–610 нм. Показатели теста нормализовывали с учетом количества клеток в культуре.

Оценка продукции протеогликанов. Количество сульфатированных ГАГ, наиболее часто встречаю-

щихся в составе протеогликанов МПД, определяли с использованием тест-системы, основанной на реакции с 1,9-диметил-метиленовым голубым [4, 5]. Клетки осаждали путем центрифугирования при 1000 об./мин в течение 4 мин, ресуспендировали в однократном натрий-фосфатном буферном растворе с последующей заморозкой до -80°C для последующего анализа. Перед проведением исследования образцы размораживали и центрифугировали. Клетки из каждого флакона ресуспендированы в 1 мл 100 мМ Na_2HPO_4 , содержащим 50 мкг/мл протеиназы К; pH раствора доведен до 8,0 с использованием 1N HCl. Полученный раствор с целью лизиса клеток инкубировали при температуре 56°C 12 ч, а затем при температуре 90°C в течение 10 минут для инактивации протеиназы К. Образцы пипетировали в 96-луночные планшеты и добавляли заранее приготовленный раствор 1,9-диметил-метиленового голубого с pH 3,0. После этого незамедлительно производили измерение абсорбции на планшетном спектрофлуориметре (Tecan Infinite 200Pro, 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.

Статистическая обработка произведена в программе Microsoft Excel и Statistica 9.0. Используются критерии непараметрической статистики для независимых групп сравнения. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами исследована жизнеспособность, метаболическая активность и экспрессия протеогликанов КПЯ и КФК МПД под воздействием КМБ 2 в различных концентрациях. КМБ 2 является цитокином с мощным остеиндуктивным действием и потенциально может влиять на секрецию протеогликанов, одного из основных компонентов межклеточного матрикса, недостаток которого наблюдается при дегенерации МПД [3, 15].

При подсчете количества клеток и проведении теста на их жизнеспособность установлено, что культивирование клеток МПД в течение 5 дней в присутствии КМБ 2 разных концентраций не снижает жизнеспособность клеток. Во всех исследуемых образцах более 90 % клеток были живыми (рис. 1а). При этом выявлена тенденция к увеличению пролиферативной активности КПЯ и КФК культивируемых в среде с КМБ 2, с увеличением концентрации данного цитокина (рис. 1б). Тем не менее, высокое значение дисперсии контрольных групп не позволяет сделать заключение о значимости различий при заданной мощности исследования. Полученные результаты свидетельствуют, что КМБ 2 влияет на пролиферативную и метаболическую активность КПЯ и КФК.

Выявлено значимое увеличение метаболической активности КФК при культивировании в среде с КМБ 2 100 нг/мл ($p = 0,04$) и 200 нг/мл ($p = 0,04$) (рис. 2). При этом статистически значимых различий между нормализованными значениями метаболической активности КФК в группах с КМБ 2 различных концентраций не выявлено ($p = 0,12$). Выявлено отсутствие значимых различий метаболической активности КПЯ между группами инкубации с КМБ 2 и в контрольных средах ($p = 0,7$).

Тест с 1,9-диметил-метиленовым голубым показал увеличение содержания ГАГ в группах культивирования с КМБ 2 (рис. 3). Статистически значимые различия получены между контрольной группой КФК и группами КФК, культивируемыми в среде с КМБ 2 100 нг/мл ($p = 0,04$) и 200 нг/мл ($p = 0,04$). В ряде культур КПЯ, культивируемых с КМБ 2, зарегистрировано высокое содержание ГАГ, превышающее соответствующие значения в контрольных группах. Тем не менее, изменение продукции протеогликанов в группах КПЯ статистически значимых различий не достигло ($p = 0,12$).

Полученные результаты свидетельствуют об анаболическом эффекте КМБ 2 по отношению к клеткам МПД, в особенности в отношении биосинтетической активности КФК. Несмотря на то, что общее количество КФК имело тенденцию к снижению под

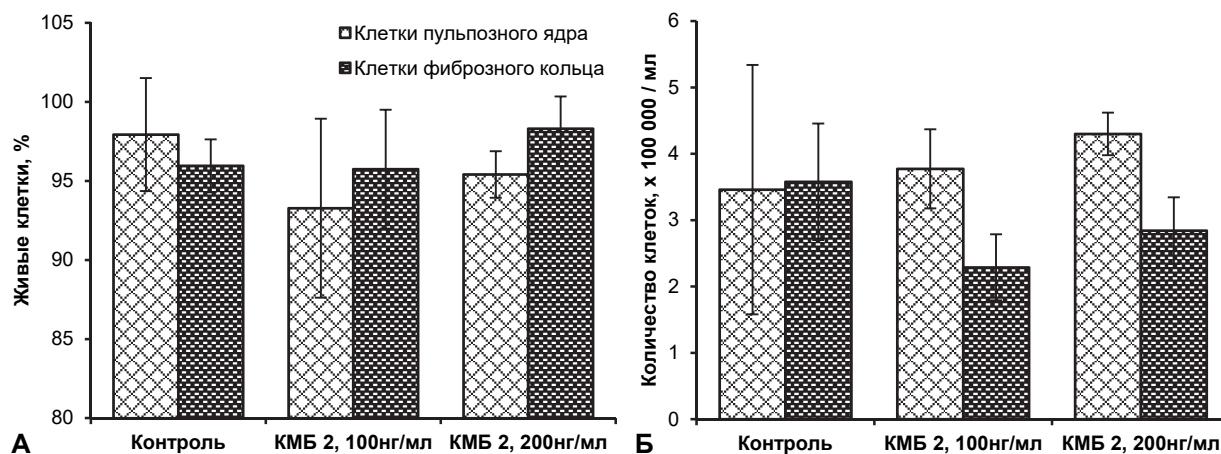


Рис. 1. Оценка жизнеспособности (а) и пролиферативной активности (б) клеток пульпозного ядра и фиброзного кольца межпозвоночного диска под влиянием костного морфогенетического белка 2 различных концентраций.

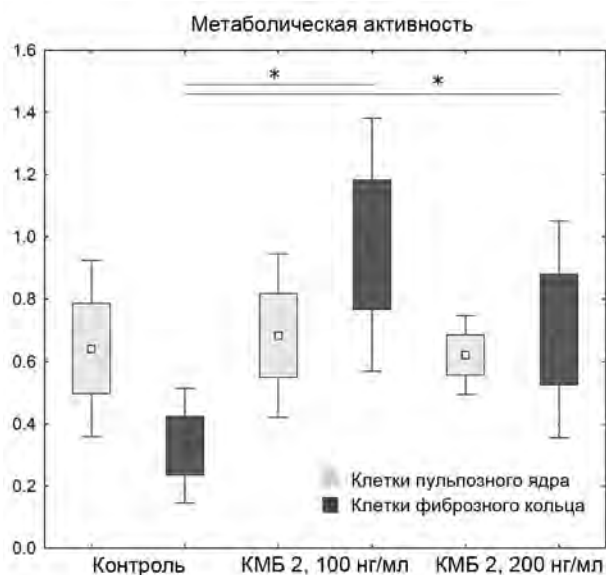


Рис. 2. Оценка метаболической активности клеток пульпозного ядра и клеток фиброзного кольца межпозвоночного диска под влиянием костного морфогенетического белка 2 различных концентраций.

воздействием КМБ 2, нормализованные показатели продукции протеогликанов значительно превосходили значения в контрольной группе. Наблюдавшиеся различия в эффектах КМБ 2 на КПЯ и КФК в культурах подтверждают остеогенную направленность данного цитокина [1]. При этом наблюдается увеличение количества КПЯ по сравнению с КФК. Тем не менее, усиление биосинтетической активности, в частности продукции компонентов протеогликанов, наиболее явно выражено в КФК, имеющих фибробластоподобный фенотип. Наблюдалось увеличение уровня продукции ГАГ до схожего с КПЯ, имеющих хондробластоподобный фенотип. Несмотря на относительное увеличение количества КПЯ под воздействием КМБ 2, различия в биосинтетической активности по сравнению с контролем не значимы. Проведение исследования с большей мощностью в будущем может привести к установлению значимого увеличения продукции ГАГ.

Таким образом, исследование применения различных концентраций КМБ 2 в культурах клеток МПД показало значимое увеличение метаболической активности и синтеза протеогликанов КФК. Проведенный эксперимент показал, что КМБ 2 в концентрациях 100 и 200 нг/мл не изменяет метаболическую активность КПЯ и незначительно влияет на продукцию ими протеогликанов. КМБ 2 обладает умеренным регенеративным потенциалом в отношении моделирования продукции гидрофильного компонента экстрацеллюлярного матрикса МПД.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФ, проект №15-15-30037.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Булатов А.А., Савельев В.И., Калинин А.В. Применение костных морфогенетических белков в экс-

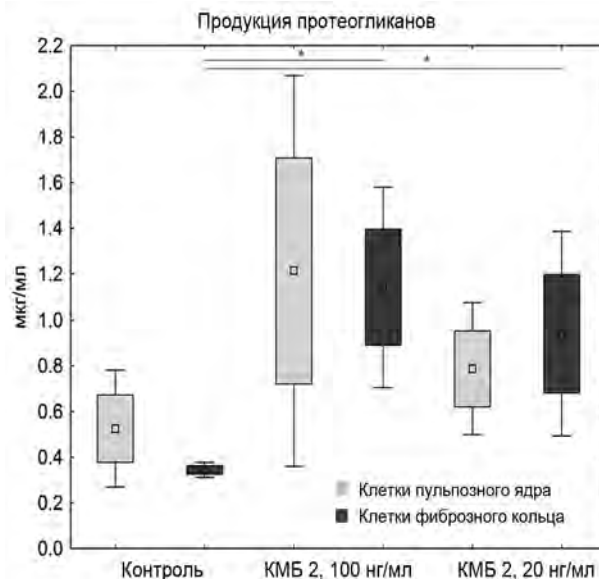


Рис. 3. Оценка синтеза протеогликанов в культурах клеток пульпозного ядра и фиброзного кольца межпозвоночного диска под влиянием костного морфогенетического белка 2 различных концентраций.

перименте и клинике // Травматология и ортопедия России. – 2005. – № 1 (34). – С. 46–54.

Bulatov AA, Savel'ev VI, Kalinin AV (2005). Experimental and clinical use of bone morphogenetic proteins [Primenenie kostnykh morfogeneticheskikh belkov v eksperimente i klinike]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*, (1), 46-52.

2. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Белых Е.Г., Гиерс М., Прул М. Цитокиновые механизмы дегенерации межпозвоночного диска // Сибирский медицинский журнал. – 2015. – № 5. – С. 17–21.

Byvaltsev VA, Belykh EG, Stepanov IA, Giers M, Preul M (2015). Cytokine mechanisms of intervertebral disc degeneration [Tsitokinovye mekhanizmy degeneratsii mezhpozvonkovogo diska]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*, (5), 17-21.

3. Belykh E, Giers M, Bardonova L, Theodore N, Preul M, Byvaltsev V (2015). The role of bone morphogenetic proteins 2, 7, and 14 in approaches for intervertebral disk restoration. *World Neurosurg.*, 84 (4), 870-877.

4. Coulson-Thomas V, Gesteira TF (2014). Dimethylmethylene Blue Assay (DMMB). *Bio-protocol*, 4 (18), e1236. Available at: <http://www.bio-protocol.org/e1236>.

5. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta.*, (883), 173-177.

6. Gantenbein B, Illien-Jünger S, Chan SC, Walser J, Haglund L, Ferguson SJ, Iatridis JC, Grad S (2015). Organ culture bioreactors – platforms to study human intervertebral disc degeneration and regenerative therapy. *Curr. Stem. Cell Res. Ther.*, 10 (4), 339-352.

7. Haschtmann D, Ferguson SJ, Stoyanov JV (2012). BMP-2 and TGF- β 3 do not prevent spontaneous degeneration in rabbit disc explants but induce ossification of the annulus fibrosus. *Eur. Spine J.*, 21 (9), 1724-1733.

8. Huang YC, Urban JP, Luk KD (2014). Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way? *Nat. Rev. Rheumatol.*, 10 (9), 561-566.
9. Kraemer J (2009). Intervertebral disk diseases: causes, diagnosis, treatment, prophylaxis, 368.
10. Le Maitre CL, Richardson SM, Baird P, Freemont AJ, Hoyland JA (2005). Expression of receptors for putative anabolic growth factors in human intervertebral disc: implications for repair and regeneration of the disc. *J. Pathol.*, 207 (4), 445-452.
11. Lo KW, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT (2012). Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 64 (12), 1277-1291.
12. Louis KS, Siegel AC (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol. Biol.*, (740), 7-12.
13. Nolan JS, Packer L (1974). Monolayer culture techniques for normal human diploid fibroblasts. *Meth. Enzymol.*, 32 (B), 561-568.
14. Raj PP (2008). Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment, *Pain Pract.*, (8), 18-44.
15. Tomaszewski KA, Walocha JA, Mizia E, Gladysz T, Glowacki R, Tomaszewska R (2015). Age- and degeneration-related variations in cell density and glycosaminoglycan content in the human cervical intervertebral disc and its endplates. *Pol. J. Pathol.*, 66 (3), 296-309.
16. Urban JP, Smith S, Fairbank JC (2004). Nutrition of the intervertebral disc, *Spine (Phila Pa 1976)*, (29), 2700-2709.

Сведения об авторах
Information about the authors

Бардонова Людмила Андреевна – аспирант курса нейрохирургии Иркутского государственного медицинского университета (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел.: 8 (3952) 24-38-43; e-mail: lyudmila15@inbox.ru)

Bardonova Lyudmila Andreyevna – *Postgraduate of the Course of Neurosurgery of Irkutsk State Medical University* (664003, Irkutsk, Krasnogo Vosstaniya str., 1; tel.: +7 (3952) 24-38-43; e-mail: lyudmila15@inbox.ru)

Белых Евгений Георгиевич – аспирант ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 26-50-05; e-mail: e.belykh@yandex.ru)

Belykh Evgeniy Georgiyevich – *Postgraduate of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology* (664003, Irkutsk. Bortsov Revolyutsii str., 1; tel.: +7 (3952) 26-50-05; e-mail: e.belykh@yandex.ru)

Бывальцев Вадим Анатольевич – доктор медицинских наук, и.о. заведующего научно-клиническим отделом нейрохирургии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», заведующий курсом нейрохирургии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, главный нейрохирург Департамента здравоохранения ОАО «РЖД», руководитель Центра нейрохирургии НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский ОАО «РЖД», профессор кафедры травматологии, ортопедии и нейрохирургии ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: byval75vadim@yandex.ru)

Byvaltsev Vadim Anatolyevich – Doctor of Medical Sciences, Acting Head of Clinical Research Department of Neurosurgery of Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Head of the Course of Neurosurgery of Irkutsk State Medical University, Chief Neurosurgeon of the Department of Healthcare of Russian Railways Ltd., Head of the Center of Neurosurgery of Railway Clinical Hospital at the Irkutsk-Passazhirskiy Railway Station of Russian Railways Ltd., Professor of the Department of Traumatology, Orthopaedics and Neurosurgery of Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education (664003, Irkutsk, Bortsov Revolyutsii str., 1; byval75vadim@yandex.ru)