

Межрегиональная общественная организация  
«Ассоциация хирургов-вертебрологов» России (RASS)  
Министерство здравоохранения Иркутской области  
Иркутский научный центр хирургии и травматологии  
Иркутская государственная медицинская академия  
последипломного образования  
Иркутский государственный медицинский университет  
Департамент здравоохранения ОАО «РЖД»



ИРКУТСКИЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
ФГБНУ  
ХИРУРГИИ  
И ТРАВМАТОЛОГИИ



# СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

**VIII** съезд  
межрегиональной ассоциации  
хирургов-вертебрологов России  
с международным участием

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ  
АСПЕКТЫ ПОРАЖЕНИЙ  
И ПОВРЕЖДЕНИЙ ПОЗВОНОЧНИКА**

**IV** съезд  
дорожных нейрохирургов

**МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВЛИЯНИЯ КОСТНЫХ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**БАРДОНОВА Л.А.<sup>1,2,3</sup>, БЕЛЫХ Е.Г.<sup>1,2,3</sup>, БЫВАЛЬЦЕВ В.А.<sup>1,2,3,4</sup>, ТЕОДОР Н.<sup>3,5</sup>, ПРУЛ М.<sup>2,3</sup>, ГИЕРС М.Б.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск

<sup>2</sup> Иркутский научный центр хирургии и травматологии, г. Иркутск

<sup>3</sup> Неврологический институт Барроу, г. Финикс, Аризона, США

<sup>4</sup> Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский ОАО «РЖД», Центр нейрохирургии, г. Иркутск

<sup>5</sup> Госпиталь Джона Хопкинса, г. Балтимор, Мэриленд, США

*Проведено исследование динамики пролиферативной активности клеток межпозвонкового диска под влиянием костных морфогенетических белков. Эксперимент выполнялся на клеточных культурах, полученных из клеток фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска человека, культивированных с добавлением костных морфогенетических белков 2, 7 и 14. Производили ежедневный подсчет количества клеток в течение 4 суток, затем клетки окрашивали на F-актин и на ядерную ДНК с исследованием на лазерном конфокальном микроскопе. Скорость роста клеток в каждом случае вычислялась путём математического моделирования. Выявлено, что темпы роста клеток обоих типов клеток не были существенно изменены под влиянием костных морфогенетических белков. Формы клеток – звездчатые, веретенообразные с длинными отростками для обоих типов клеток.*

**MATHEMATICAL MODEL OF INFLUENCE OF BONE MORPHOGENETIC PROTEINS ON INTERVERTEBRAL DISC CELL PROLIFERATION**

**BARDONOVA L.A.<sup>1,2,3</sup>, BELYKH E.G.<sup>1,2,3</sup>, BYVALTSEV V.A.<sup>1,2,3,4</sup>, THEODORE N.<sup>3,5</sup>, PREUL M.C.<sup>2,3</sup>, GIERS M.B.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Irkutsk State Medical University, Irkutsk

<sup>2</sup> Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk

<sup>3</sup> Barrow Neurological Institute, Phoenix, Arizona, USA

<sup>4</sup> Railway Clinical Hospital on the station Irkutsk-Passazhirskiy of Russian Railways Ltd., Irkutsk

<sup>5</sup> Johns Hopkins Hospital, Baltimore, Maryland, USA

*The study was aimed to investigate the proliferation of intervertebral disc cells under the influence of bone morphogenetic proteins. Human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells were cultured in medium supplemented with bone morphogenetic proteins 2, 7 and 14. Daily cell counts were collected from phase contrast micrographs using the Fiji program. On the 4th day cells were fixed and stained with phalloidin for F-actin and DAPI for nuclear DNA, and imaged using a laser confocal microscope. Growth rates of annulus fibrosus and nucleus pulposus cells were not significantly affected by the presence of bone morphogenetic proteins. The growth rate was the same for both cell types. Cells were spindle shaped with long protrusions and cell morphology did not appear qualitatively different between cell types*

**ВВЕДЕНИЕ**

Дегенерация межпозвонкового диска (МПД) является сложным процессом, включающим в себя изменения в питании МПД, снижение жизнеспособности и количества клеток, количественные и качественные изменения межклеточного матрикса, а также изменения биомеханики [5]. Сложность патофизиологических механизмов развития дегенерации МПД затрудняет поиск потенциальных терапевтических мишеней. Активно изучаемой стратегией биологической коррекции ранней степени дегенерации МПД является терапия факторами роста [4], к которым относятся в том числе и костные морфогенетические белки. На ранней стадии дегенеративного процесса они стимулируют экспрессию компонентов межклеточного матрикса функционально активными клетками МПД, что может являться основой биологической терапии и способствовать восстановлению структуры и функции МПД [1, 3]. Успешность данной терапии

напрямую зависит от наличия достаточного числа жизнеспособных клеток [2].

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследовать динамику пролиферативной активности клеток под влиянием костных морфогенетических белков 2, 7 и 14 (ВМР).

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Клеточные культуры, полученные из фиброзного кольца и пульпозного ядра межпозвонкового диска человека, культивировали в 4 группах для каждого типа клеток: 1) клетки, выращиваемые в контрольной среде; 2) клетки, выращиваемые в среде с добавлением ВМР-2; 3) клетки, выращиваемые в среде с добавлением ВМР-7; 4) клетки, выращиваемые в среде с добавлением ВМР-14 (Bone Morphogenetic Proteins Human Recombinant, ProSpec, США). Клетки культивировали в монослое в чашках Петри диаметром 35 мм со стеклянным



дном диаметром 10 мм в инкубаторе в условиях 95% влажности и 5% содержания CO<sub>2</sub> при 37 °С. Смену питательных сред проводили каждые два дня. Культивирование клеток всех групп проводили в течение 4 суток. Ежедневный подсчёт количества клеток производили на микрофотографиях, полученных путём фотографирования камерой Canon на увеличении 200× 6 полей зрения каждой культуральной чашки, анализ проводили в программе Fiji (NIH, США) с использованием плагина для подсчёта клеток (Schindelin J., 2012). После 4 суток культивирования в средах, обогащённых BMP 2, 7 или 14, клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида, окрашивали фаллоидином на актин и DAPI на ядерную ДНК с последующим исследованием методом лазерной конфокальной микроскопии (Zeiss LSM 7 Duo, Carl Zeiss, Германия). Статистическая обработка проводилась в программе Microsoft Excel и Statistica 9.0. Количество клеток нормализовали по отношению к плотности засеивания. Скорость роста клеток в каждом случае вычислялась путём математического моделирования в их экспоненциальной фазе роста.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Исходное количество клеток в культурах клеток фиброзного кольца (КФК) было значительно больше, чем в культурах клеток пульпозного ядра (КПЯ),  $p = 0,01$ . При сравнении количества клеток в культурах выявлено отсутствие значимого эффекта наличия BMP, а также типа BMP на пролиферацию клеток ( $p = 0,17$ ). Значимое увеличение КПЯ происходило ежедневно в течение 4 дней эксперимента ( $p = 0,01$  до  $p = 0,04$ ). Значимое увеличение КФК отмечалось в течение первых 2 дней ( $p < 0,01$ ) и затем достигало непрерывного слоя. В связи с этим, рост популяции клеток рассчитан с учётом первых двух дней для культур КФК и 4 дней для культур КПЯ. Модель роста клеток рассчитывали, исходя из нормализованного числа клеток, что позволило определить коэффициенты роста для клеточных популяций. Выявлено, что темпы роста клеток как фиброзного кольца, так и пульпозного ядра не были существенно изменены под влиянием BMP 2, 7, 14. Темпы роста были одинаковы для обоих типов клеток.

При проведении иммуноцитохимического исследования с окраской на актиновый цитоскелет КПЯ и КФК имели схожие морфологические формы. При 100% конfluенции КФК и КПЯ имели веретенообразную форму с продольной ориентацией в одном направлении, либо радиально к центрам скопления клеток. Клетки в культурах, не достигших полной конfluенции, были продолговатые звездчатые с 3–4 отростками, реже

веретенообразные. Актиновый цитоскелет хорошо выражен, микрофиламенты располагаются равномерно по всей площади клетки. Ближе к краю клеток актиновые филаменты образуют окрашенные гиперинтенсивные скопления в виде глыбок, свидетельствуя об активной сборке актина. Ядра клеток ровные овальные, размером от 15 до 30 мкм в диаметре. Таким образом, морфология клеток не явилась качественным отличием между типами клеток.

### ВЫВОДЫ

Проведённое исследование показало отсутствие пролиферативной активности под влиянием различных BMP в обоих типах клеток. Мы попытались учесть различия в начальной плотности клеток путём моделирования клеток в их экспоненциальной фазе роста. Контактующие клетки могут испытывать контактное ингибирование пролиферации и, следовательно, уменьшить разницу в подсчёте клеток. Из-за ограниченного запаса питательных веществ в МПД регенеративная терапия должна влиять на производство белка, но не обязательно увеличивать численность клеток, что приведёт к возрастанию спроса на питательные вещества. Потенциал костных морфогенетических белков в аспекте регенеративной терапии поддерживается их воздействием на синтез внеклеточного матрикса, нежели влиянием на пролиферацию клеток.

*Исследование выполнено за счёт гранта Российской государственной академии наук (проект № 15-15-30037).*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Biological treatment approaches for degenerative disk disease: a literature review of in vivo animal and clinical data / Y. Moriguchi, M. Alimi, T. Khair, G. Manolarakis et al. // *Global Spine Journal*. 2016. Vol. 6 (5). P. 497–518.
2. Biologic treatment of mild and moderate intervertebral disc degeneration / E. S. Vasiliadis, S. G. Pneumaticos, D. S. Evangelopoulos, A. G. Papatavassiliou // *Molecular medicine*. 2014. Vol. 20 (1). P. 400–409.
3. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig et al. // *Nature methods*. 2012. Vol. 9 (7). P. 676–682.
4. Growth factors and platelet-rich plasma: promising biological strategies for early intervertebral disc degeneration / S. Z. Wang, Q. Chang, J. Lu, C. Wang // *Int. Orthop*. 2015. Vol. 39 (5). P. 927–934.
5. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration / C. Q. Zhao, L. M. Wang, L. S. Jiang, L. Y. Dai // *Ageing Res. Rev*. 2007. Vol. 6 (3). P. 247–261.