

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



УДК 616.71–018.3–092.4–089.843

## ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ АУТОЛОГІЧНИХ ХОНДРОЦИТІВ НА СТАН МІЖХРЕБЦЕВИХ ДИСКІВ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ ОСТЕОХОНДРОЗУ

М. В. Хижняк

Інститут нейрохірургії імені А. П. Ромоданова НАМН України, м. Київ

## INFLUENCE OF AUTOLOGOUS CHONDROCYTES TRANSPLANTATION ON THE INTERVERTEBRAL DISC STATE IN EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOCHONDROSIS

M. V. Khyzhnyak

У складення дегенеративних захворювань хребта є однією з основних причин непрацездатності пацієнтів, адже, майже 75% людей протягом життя хоча б одного разу відчувають біль у спині [1]. Дегенеративний процес у МХД, насамперед, асоціюється з біохімічними та морфологічними змінами, що впливають на біомеханічні властивості ураженого хребцево—рухового сегмента хребта. Перші прояви дегенерації виникають у ДЯ МХД внаслідок прогресуючої втрати протеогліканів, води та колагену II типу. Оскільки клітини ДЯ та волокнистого кільця не здатні до регенерації, лікування хворих переважно симптоматичне. Існуючі методи лікування, в тому числі хірургічні, спрямовані на усунення лише окремих симптомів захворювання і не забезпечують зникнення патологічних змін, що спричиняють послідовне ураження більшості МХД. У зв'язку з цим протягом багатьох років ведуться розробки біологічної спрямованості — застосування досягнень тканинної та клітинної інженерії, молекулярної біології, генної терапії [2 — 4]. Результати експериментальних розробок досить суперечливі.

Для вивчення морфогенезу і патогенезу дегенеративних змін хребта використовують численні моделі, у тому числі — біологічні, на яких

### Реферат

В основі остеохондрозу хребта лежать дегенеративні зміни в драглистому ядрі (ДЯ) та волокнистому кільці міжхребцевих дисків (МХД). Для вивчення морфогенезу й патогенезу дегенеративних змін хребта використовують численні моделі, у тому числі біологічні, на яких відпрацьовують і вивчають окремі механізми їх перебігу. Експериментальні методи посідають важливе місце у порівняльних дослідженнях, особливо — різних методів лікувального впливу на тканини МХД при дегенеративних змінах хребта. В експериментальній моделі остеохондрозу на щурах проаналізовані біохімічні зміни структур МХД в умовах введення культивованих аутологічних клітин суспензії ДЯ.

**Ключові слова:** остеохондроз; міжхребцеві диски; аутотрансплантація хондроцитів; collagen; aggrecan; експеримент.

### Abstract

The degenerative changes in the nucleus pulposus and fibrous ring of the intervertebral discs are the basis of spinal osteochondrosis. A large number of models, including biological, where some mechanisms of their development were worked out and studied, was used to study the morphogenesis and pathogenesis of degenerative spinal changes. The deserved place in the comparative experiments and especially the different methods of therapeutic effects on the tissues of the intervertebral discs in degenerative spinal changes is taken by the experimental methods. The biochemical changes of the intervertebral disc structures were analyzed under the administration of cultured autologous cell of nucleus pulposus suspension against a background of experimental model of rat osteochondrosis.

**Key words:** osteochondrosis; intervertebral discs; autotransplantation of chondrocytes; collagen; aggrecan; experiment.

відпрацьовують та вивчають окремі механізми їх перебігу [5 — 8].

Клітини МХД використовують в експерименті на тваринах вже понад 15 років і як пілотний проект у пацієнтів (програма EuroDISC) — майже 13 років [9]. Як правило, експлантують аутогенні або алогенні клітини, потім культивують їх в умовах *ex vivo*, нарощують в суспензії та імплантують [10]. Відзначені позитивні результати використання пря-

мої внутрішньодискової ін'єкції суміші матриксних компонентів, так званого "розчину диска" [11], імплантації аутогенних клітин ДЯ [12], фібро— та хондробластів [13], клітин хрящової тканини.

Однією з найбільш вдалих, з нашої точки зору, щодо вивчення етіології та патогенезу структурних змін МХД є модель на щурах, у яких відтворюють довгострокову асиметричну компресію (АК) МХД сег-

ментів хвостового відділу хребта [14]. В наших попередніх дослідженнях [15 — 17] доведено, що ця модель відтворювана, експериментальний вплив достатньо стереотипний, не потребує застосування складних пристроїв, крім того, патологічні зміни в структурі МХД та тілах хребців значною мірою відповідають таким за дегенеративно—дисτροφічного ураження хребта людини в умовах компресії МХД.

Таким чином, проведення експериментальних досліджень з метою розробки й впровадження у клінічну практику високотехнологічного методу лікування хворих з приводу дегенеративного ураження хребта є актуальним завданням сучасної біомедицини та спінальної нейрохірургії.

Мета роботи: вивчити вплив культивованих аутологічних клітин суспензії ДЯ на біохімічні властивості структур МХД в умовах експериментальної моделі остеохондрозу.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Постійну та тимчасову АК МХД хвостового відділу хребта з подальшою релаксацією моделювали у лабораторних білих щурів—самців популяції експериментально—біологічного відділу Інституту нейрохірургії, маса тіла 280 — 300 г, вік 4 міс. Здійснювали резекцію дистальної частини хвоста з його подальшою фіксацією у зігнутому положенні протягом від 1 до 4 міс. Дослідження проведені відповідно

до сучасних вимог біоетики та гуманного ставлення до тварин, правил Європейської конвенції з захисту тварин та Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" (2006). Тварин вводили в наркоз шляхом внутрішньом'язового введення розчину каліпсола (50 мг/кг). Для місцевої анестезії в основу хвоста вводили 0,4 мл 2% розчину лідокаїну.

Клітини для культивування та аутотрансплантації отримували з ДЯ МХД резексованої частини хвостового відділу хребта. Клітини культивували в поживному середовищі у стандартних умовах (в CO<sub>2</sub>—інкубаторі при температурі 37 °С, вміст CO<sub>2</sub> — 5%). Через відповідні строки клітини відмивали від живильного середовища триразовим об'ємом ізотонічного розчину натрію хлориду, давали відстоятися протягом 30 хв, готували суспензію для трансплантації. Живі клітини в суспензії підраховували в камері Горяєва, їх вміст становив 90 — 95%. Для візуалізації клітин використовували світловий мікроскоп (ЛОМО, Росія). У відповідні строки дослідним тваринам здійснювали аутотрансплантацію культивованої суспензії клітин ДЯ пункційним методом у кількості 5 × 10<sup>6</sup> клітин в 1 мл до повного заповнення дефекту.

З використанням ланцюгової реакції з полімеразою (ЛРП) досліджували експресію мРНК генів aggrecan 1 та collagen type II (COL II) alpha 1 в тканині МХД тварин дослідних груп. РНК виділяли стандартним методом з використанням набору "Рибо—

сорб" ("Amplisens", Росія) відповідно до протоколу. Кількість РНК визначали на апараті СФ—26 за довжини хвилі 260 і 280 нм у порівнянні з контролем. Реакцію оберненої транскрипції проводили з використанням набору "RevertAidtm First strand cDNA synthesis kit" ("Fermentas", Литва) за протоколом.

ЛРП проводили з використанням ампліфікатора "Терцик" ("ДНК—технологія", Росія) та набору для проведення класичної ЛРП "PCR—core" ("GENPAQ", Росія). Експресію гена COL II досліджували з використанням пари праймерів ("Fermentas", Німеччина): (for) 5'—caccgctaaccgtccagatgac — 3', (rev) 5'—ggaaggcgtgaggctctctgt — 3' (продукт ампліфікації 275 парануклеотидів — п.н.) за програмою 60°C — 2 хв (1 цикл); 95°C — 1 хв, 53°C — 40 с, 74°C — 1 хв (42 цикли), 74°C — 1 хв [18]. Експресію гена, що кодує aggrecan 1, досліджували з використанням відповідної пари праймерів: (for) 5'—ccactggagaggactgcgtag—3', (rev) 5'—ggctctgtgcaagtattcgag—3' (продукт ампліфікації 244 п.н.) за програмою 60°C — 2 хв (1 цикл); 95°C — 1 хв, 53°C — 40 с, 74°C — 1 хв (42 цикли), 74°C — 1 хв.

Електрофорез проводили в 2% агарозному гелі з використанням трис—ацетатного буфера. Продукти ампліфікації візуалізували з використанням транслюмінатора УВТ 1 ("Біоком", ТОВ "Компанія Біоком", Росія) і комп'ютерної програми "ViTRan" за протоколом. Дані електрофореграм обробляли, беручи до уваги площу та інтенсивність світіння ампліконів, перераховували на кількість клітин і виражали в умовних одиницях.

Статистичний аналіз проведений за допомогою пакетів прикладних математичних програм Statistica 6.0 та з використанням статистичних можливостей Excel.

Гіпотези про різницю у групах перевіряли за непараметричним критерієм U Mann—Whitney для визначення кількісних даних за умови, коли розподіл досліджуваної ознаки відрізнявся від нормальної хоча б в одній з порівнюваних груп.

Таблиця 1. Групи експериментальних тварин

Групи тварин	Характеристика груп
1	Інтактні
2	АК МХД 30 діб
3	АК МХД 60 діб
4	АК МХД 60 діб, релаксація 30 діб
5	АК МХД 60 діб, релаксація 60 діб
6	АК МХД 60 діб, релаксація 30 діб, введення культивованих клітин ДЯ протягом 30 діб
7	АК МХД 60 діб, релаксація 60 діб, введення культивованих клітин ДЯ протягом 60 діб
8	АК МХД 90 діб, введення культивованих клітин ДЯ протягом 60 діб
9	АК МХД 150 діб, введення культивованих клітин ДЯ протягом 90 діб

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Характеристика дослідних груп тварин представлена у *табл. 1*. В попередніх дослідженнях ми детально проаналізували морфологічні та морфометричні зміни, що виникали в структурах МХД тварин, у яких моделювали тимчасову або постійну АК МХД хвостового відділу хребта [15, 19, 20]. Доведено, що ця експериментальна модель остеохондрозу адекватна для дослідження дегенеративних змін при захворюваннях хребта і має переваги у порівнянні з іншими моделями.

Результати визначення рівня експресії гена *aggrecan 1* представлені та у *табл. 2*. У тварин групи 3 рівень експресії *aggrecan—1* вірогідно знижувався ( $p < 0,05$ ) відносно такого у тварин інтактної групи. У тварин груп 4, 5 спостерігали підвищення рівня транскриптів у порівнянні з відповідними контрольними групами тварин.

При введенні культивованих аутологічних клітин у зону ДЯ МХД, що перебували в стані тимчасової АК МХД з подальшою релаксацією (групи 6 та 7) рівень транскриптів мРНК гена *aggrecan—1* був вищим, ніж у тварин контрольних груп (групи 4 та 5). Отримані дані свідчили, що культивовані аутологічні клітини ДЯ в умовах відміни компресії активно продукують *aggrecan*. Імплантація клітин у зону ДЯ МХД в умовах постійної компресії (групи 8 і 9) не впливала на рівень експресії гена *aggrecan 1* у порівнянні з таким у тварин контрольних груп (2 і 3).

Ці результати свідчать, що відновлення трофіки після релаксації компресованих МХД сприяє поліпшенню стану ДЯ, що проявляється збільшенням експресії досліджуваного гена *aggrecan—1*, проте, значно більший вплив на рівень експресії цього гена справляє введення культивованих аутологічних клітин ДЯ (групи 6 і 7). Отримані дані щодо експресії гена *aggrecan—1* клітинами ДЯ свідчать, що введені в зону ДЯ аутологічні клітини після тривалого культивування зберігають життєздатність протягом усього періоду імплантації та активно продукують *aggrecan*, що має важливе значення

Таблиця 2. Експресія гена *aggrecan—1* в клітинах ДЯ МХД хвостового відділу хребта щурів в умовах постійної, тимчасової АК МХД та при трансплантації культивованих клітин ДЯ

Групи тварин	Кількість тварин	Експресія гена, ум. од. $\times 10^3$ в 1 мкг тканини ( $\bar{x} \pm m$ )
1	5	56,0 $\pm$ 4,7
2	3	30,0 $\pm$ 4,9*
3	4	23,1 $\pm$ 3,4**
4	4	34,5 $\pm$ 3,0
5	4	27,4 $\pm$ 3,9
6	4	46,7 $\pm$ 3,2*
7	5	38,5 $\pm$ 3,6
8	5	30,3 $\pm$ 2,5
9	4	26,0 $\pm$ 3,5

Примітка. Різниця показників достовірна: \* –  $p \leq 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ .

Таблиця 3. Експресія гена COL II клітинами ДЯ МХД хвостового відділу хребта щурів в умовах постійної, тимчасової АК МХД та при трансплантації культивованих клітин ДЯ

Групи тварин	Кількість тварин	Експресія гена, ум. од. $\times 10^3$ в 1 мкг тканини
1	6	126,8 $\pm$ 21,2
2	3	95,6 $\pm$ 3,7
3	4	70,0 $\pm$ 8,9*
4	4	103,7 $\pm$ 5,51*
5	4	102,0 $\pm$ 14,5
6	4	142,6 $\pm$ 20,8*/*
7	5	127,9 $\pm$ 26,1
8	5	119,9 $\pm$ 29,4
9	4	99,8 $\pm$ 22,1

Примітка. Різниця показників достовірна: \* –  $p < 0,05$ , \* –  $p < 0,02$ .

для підтримання гідратації ДЯ МХД.

У *табл. 3* представлені результати визначення рівня експресії гена COL II клітинами ДЯ МХД досліджуваних тварин.

У тварин груп 2 і 3 спостерігали зниження рівня експресії гена COL II відносно такого у тварин інтактної групи ( $p < 0,05$ ).

У тварин групи 5 рівень експресії гена COL II майже не відрізнявся від такого у тварин інтактної групи. У тварин груп 6 і 7 виявлений значний рівень експресії гена COL II у порівнянні з таким в усіх досліджуваних групах ( $p < 0,01$  та  $p < 0,05$ ).

Найімовірно, тривала компресія МХД (90 і 150 діб) спричиняла порушення природної трофіки поживних речовин та компонентів, необхідних для життєдіяльності клітин ДЯ, внаслідок чого частково гинули клітини, що зумовлювало дегенерацію МХД різного ступеня. При цьому клітини, що залишилися,

зберігали здатність до продукування нормальних молекул як *aggrecan*, так і *collagen*, про що свідчили отримані нами дані з вивчення експресії генів *aggrecan—1* та COL II у тварин, які перебували в умовах АК МХД різної тривалості. Збільшення синтезу ключових молекул ДЯ, в тому числі *aggrecan* та *collagen II* типу, завдяки культивованим клітинам, імплантованим в зону ДЯ, що спостерігали у відповідних групах тварин, з нашої точки зору, значно поліпшує стан МХД, що зазнали компресії.

## ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗРОБОК

1. В групах тварин за тимчасової компресії та подальшої релаксації хвостового відділу хребта спостерігали підвищення рівня експресії генів *aggrecan—1* та COL II у порівнянні з таким у тварин контрольних груп.

2. Імплантація аутогенних клітин в зону ДЯ МХД в умовах релаксації після усунення компресії сприяла вірогідному збільшенню рівня експресії генів aggrecan—1 та COL II у порівнянні з таким у тварин контрольних груп.

3. Запропонована експериментальна модель остеохондрозу, основана на АК МХД, є адекватною для проведення подальших досліджень.

3. Запропонована експериментальна модель остеохондрозу, основана на АК МХД, є адекватною для проведення подальших досліджень.

## ЛІТЕРАТУРА

- Physical activity is associated with elevated arterial stiffness in patients with lumbar disk herniation / G. Jin, Z. G. Cao, Y. N. Zhang, Y. Li // *J. Spin. Disord. Tech.* — 2015. — N 1. — P. 30 — 34.
- BMP—2 induction and TGF— $\beta$ 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis / K. Hanada, L. Solchaga, A. Caplan [et al.] // *J. Cell Biochem.* — 2001. — Vol. 81. — P. 284 — 294.
- Gene therapy for spinal applications / C. Hidaka, S. Khan, J. Farmer [et al.] // *Orthop. Clin. N. Am.* — 2002. — Vol. 33. — P. 439 — 446.
- Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture / J. Y. Wang, A. E. Baer, V. Kraus [et al.] // *Spine.* — 2001. — Vol. 26. — P. 1747 — 1752.
- Ave animal models useful for studying Ruman disc disorders/degeneration / M. Alini, S. M. Eisenstein, K. Ito [et al.] // *Eur. Spine J.* — 2008. — Vol. 17. — P. 2—19.
- Recent advances in annular pathobiology provide insights into rim—lesion mediated intervertebral disc degeneration and potential new approaches to annular repair strategies / J. Melrose, S. M. Smith, Ch. B. Little [et al.] // *Ibid.* — N 9. — P. 1131 — 1148.
- Sensitivity of notochordal disc cells to mechanical loading: an experimental animal study / T. Guehring, A. Nerlich, M. Kroeber [et al.] // *Ibid.* — 2010. — Vol. 19, N 1. — P. 113 — 121.
- Хижняк М. В. Експериментальна модель дегенерації міжхребцевих дисків хвостового відділу у щурів / М. В. Хижняк, В. В. Григоровський, Ю. Г. Гафійчук // *Укр. нейрохірург. журн.* — 2012. — № 2. — С. 58 — 61.
- 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, N 1. — P. 5 — 21.
- Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration discus / C. Hohaus, T. M. Ganey, Y. Minkus, H. J. Meisel // *Eur. Spine J.* — 2008. — Vol. 17, N 4. — P. 492 — 503.
- Biochemical injection treatment for discogenic low back pain: a pilot study / R. G. Klein, B. C. Eek, C. W. O'Neill [et al.] // *Spine.* — 2003. — Vol. 3. — P. 220 — 226.
- Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women / S. M. Pluijm, H. W. van Essen, N. Bravenboer [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2004. — Vol. 63. — P. 71 — 77.
- Sequence variations in the collagen IX and XI genes are associated with degenerative lumbar spinal stenosis / N. Noponen—Hietala, E. Kyllonen, M. Mannikko [et al.] // *Ann. Rheum.* — 2003. — Vol. 62. — P. 1208 — 1214.
- Патоморфологические изменения межпозвоноковых дисков и тел позвонков хвоста крыс при асимметричной статичной компрессии—дистензии в эксперименте / В. В. Григоровский, М. В. Хижняк, И. Г. Васильева [и др.] // *Укр. нейрохірург. журн.* — 2011. — № 3. — С. 59 — 65.
- Патоморфологические изменения межпозвоночных дисков хвостового отдела крыс при асимметричной статичной компрессии—дистензии в эксперименте / В. В. Григоровский, М. В. Хижняк, И. Г. Васильева [и др.] // *Материалы конф. "Сучасні дослідження в ортопедії та травматології"* — X., 2011. — С. 73 — 74.
- Пат. 71697 Україна, МПК G09B 23/28, A61B 17/00. Спосіб моделювання статичної асиметричної компресії на міжхребцеві диски у щурів / М.В. Хижняк, Ю.Г. Гафійчук; заявник і патентовласник ДУ "Ін—т нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України". — №U2001115512; заявл. 28.12.11; опубл. 25.07.12. Бюл. № 14.
- Григоровский В. В. Морфометрические показатели межпозвоночных дисков хвостового отдела позвоночника крыс при моделировании постоянной и временной асимметрической компрессии—дистензии / В. В. Григоровский, М. В. Хижняк, Ю. Г. Гафійчук // *Рос. нейрохірург. журн. им. А. Л. Поленова.* — 2013. — № 2. — С. 10 — 18.
- Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue / L. Peng, Z. Jia, X. Yin [et al.] // *Stem Cells Dev.* — 2008. — Vol. 17, N 4. — P. 761 — 773.
- Autotransplantation of chondroblasts into intervertebral discs condition of asymmetrical compression in experiment / I. Vasilyeva, I. Shuba, M. Khyzhnyak [et al.] // *Materials of the EANS Congr.* — Rome, 2011.
- Васильева І. Г. Експресія генів Aggrecan—1 та COL II при ауто—трансплантації хондробластів у міжхребцеві диски в експериментальній моделі остеохондрозу / І. Г. Васильева, Ю. Г. Гафійчук, І. М. Шуба // *Пробл. військової охорони здоров'я.* — 2012. — Т. 2, вип. 24. — С. 425 — 429.

