

ВПЛИВ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ НА МОРФОГЕНЕЗ ТА ЕКСПРЕСІЮ ХОНДРОГЕННИХ МАРКЕРНИХ ГЕНІВ ХОНДРОЦИТОПОДІБНИМИ КЛІТИНАМИ NUCLEUS PULPOSUS ЩУРА *IN VITRO*

Є.Г. ПЕДАЧЕНКО¹, І.Г. ВАСИЛЬЄВА², М.В. ХИЖНЯК³, Н.Г. ЧОПИК⁴, Н.П. ОЛЕКСЕНКО⁵, І.М. ШУБА⁶, О.І. ЦЮБКО⁷, О.С. ГАЛАНТА⁸, Н.Д. СНИЦАР⁹, Т.А. МАКАРОВА¹⁰, А.Б. ДМИТРЕНКО¹¹

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України». 04050, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна

E-mail: pedach@i.ua¹, vigvasileva@gmail.com², Khyzhnyak63@gmail.com³, natalia.chopyck@gmail.com⁴, n.oleksenko@gmail.com⁵, irina_shuba@ukr.net⁶, tsjubkoolga@gmail.com⁷, lenagalanta@gmail.com⁸, 1866600@online.ua⁹, tatyana.makarova77799@gmail.com¹⁰, angelikdmiz.bor@gmail.com¹¹

Метою дослідження було вивчення впливу 3, 10, 20 % збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) щура на морфобіологічні характеристики хондроцитоподібних клітин *nucleus pulposus* (NP) щура, а також експресію хондрогенних генів *ACAN*, *COL II*, *GPC3*, *MGP*, *PTN*, *ANXA3*; *VIM in vitro*. ЗТП 3, 10, 20 % дозозалежно підвищує життєздатність клітин NP щура в культурі. Тромбоцити в культурах демонструють тропність до бластоподібних клітин, формують зону адгезії. При використанні ЗТП 20 % на 14 добу культивування спостерігається диференціювання бластоподібних клітин, ресструються клітини на стадії ділення. ЗТП дозозалежно запобігає зниженню експресії хондрогенних генів. Більш ефективною є ЗТП 20 %. В цих культурах спостерігалось збільшення експресії більшості досліджуваних хондрогенних генів: *COL II* в 2,9 ($P = 0,002$); *VIM* в 2,1 ($P = 0,0003$); *ANXA3* в 2,3 ($P = 0,0003$); *GPC3* в 1,4 ($P = 0,0011$); *PTN* в 1,6 ($P = 0,0017$); *ACAN* в 1,2 ($P = 0,0606$) рази.

Ключові слова: збагачена тромбоцитами плазма, *ACAN*, *COL II*, *GPC3*, *MGP*, *PTN*, *ANXA3*; *VIM*.

Вступ. Дегенерація міжхребцевого диску (IVD), вважається основною причиною больових відчуттів у нижній частині спини. Доведено, що дегенеративні зміни починаються в *nucleus pulposus* (NP). В результаті в NP знижується вміст протеогліканів та колагену II типу, NP втрачає осмотичні властивості та стає фіброзним [1].

В даний час розробляються методи біологічної терапії міжхребцевого диску. Один з таких методів – використання біопродукту – збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) [2–4]. Обґрунтуванням є високий вміст в ЗТП біо-

активних компонентів, можливість використання для отримання ЗТП аутологічної крові, а також можливість виключити використання білків тваринного походження, а отже ризик імунних реакцій та зараження.

В сучасній медицині ЗТП використовується в декількох областях – стоматологія ортопедія, пластична хірургія. Фундаментальні, доклінічні та клінічні дослідження опубліковані в останні 10 років вказують на позитивні результати застосування ЗТП для регенерації хрящової тканини [5–7]. Останнім часом ЗТП використовується при травмах у спортсменів для відновлення колінного суглобного хряща [8, 9]. Позитивні результати відмічаються при застосуванні ЗТП для відновлення гомілковостопного хряща [10]. Використання ЗТП в клінічній практиці сприяє скорішому відновленню функцій і, таким чином, поліпшує якість життя. Анаболічні властивості ЗТП спонукають до вивчення її впливу на клітини міжхребцевого диску, зокрема клітини NP, які підлягають природній поступовій дегенерації, що супроводжується больовими синдромами, зниженням, або втратою працездатності.

У ЗТП виявлені сотні цитокінів, хемокінів, інтегринів з хондроцитопротекторними властивостями [11–14]. До них відносяться виявлені в тромбоцитах анаболічні фактори: TGF-beta, IGF, FGF-beta, PDGF [15–17]. У багатьох дослідженнях *in vitro* відмічається позитивний вплив ЗТП на проліферацію хондроцитів [18–22]. Ефект спостерігається протягом 4, 8, 12 і навіть 20 діб у моношаровій та тривимірній культурі [18, 21, 23]. Показано дозозалежне збільшення проліферації у моношаровій культурі протягом 20 діб [19, 20].

© Є.Г. ПЕДАЧЕНКО, І.Г. ВАСИЛЬЄВА, М.В. ХИЖНЯК, Н.Г. ЧОПИК, Н.П. ОЛЕКСЕНКО, І.М. ШУБА, О.І. ЦЮБКО, О.С. ГАЛАНТА, Н.Д. СНИЦАР, Т.А. МАКАРОВА, А.Б. ДМИТРЕНКО, 2019

Результати досліджень із впливу ЗТП на диференціювання хондроцитів мають розходження. Розходження можуть бути пов'язані з розбіжностями у способі отримання ЗТП [18, 19, 23]. Деякі автори вказують, що 10 % ЗТП та ЗТП супернатант збільшують експресію генів *COL II*, *ACAN* та синтез відповідних білків порівняно з 10 % FBS [23]. Дослідження також показують, що ЗТП індукуює синтез протеїнів, асоційованих з диференціюванням хондроцитів, зокрема, плеотрофіну, який підвищує експресію *SOX9* – фактора транскрипції асоційованого з диференціюванням хондроцитів [24, 25].

Для нормального функціонування NP важлива гомеостатична продукція матриксних білків агрекану та колагену II типу [26]. Відомо, що клітини дегенеруючого NP мають знижений рівень експресії цих білків [27, 28]. Агрекан виконує основну роль у підтримці осмотичної рівноваги в NP. У процесі хондрогенезу в NP синтезується також протеоглікан гліпікан [29]. Гліпікан пов'язаний з клітинною мембраною через фосфатидилінозитол [30]. Рівень експресії *GPC3* в NP деяких видів відрізняється від такого в *annulus fibrosus* (AF) [31]. Для NP щура експресія *GPC3* є маркерною [32]. Маркерними білками NP щура також є плеотрофін та анексин-3 [32]. Плеотрофін – гепарин-зв'язувальний білок у хондроцитах регулює проведення сигналів, індукуює хемотаксис та проліферацію. Плеотрофін розглядається як новий аутокринний протектор хрящової тканини. Відомо, що експресія гена *PTN* більш характерна для хондроцитів, що розвиваються, в деяких випадках може спостерігатись ре-експресія *PTN* [33]. Анексин-3 – кальційзалежний фосfolіпід-зв'язувальний білок бере участь у регуляції росту клітини, організації клітинної мембрани та її проникності. У молодих NP щурів виявлені більш високі рівні мРНК *ANXA3* ніж у тканині AF [34, 35]. У хондроцитах експресується також маркерний ген *MGP*. *MGP* кодує матриксні білки сімейства GLA. Їхня функція – інгібування кальцифікації хряща [36]. Експресія гена *MGP* у NP корелює як з віком, так і зі ступенем дегенерації. Вважається, що індукція *MGP* в NP може запобігти кальцифікації, яка характерна для старіючого диску [37, 38]. Низька експресія

MGP у проліферуючих хондроцитах може індукувати апоптоз [39].

Метою даного дослідження було вивчення впливу 3, 10 та 20 % ЗТП щура на морфобіологічні характеристики хондроцитоподібних клітин NP щура – життєздатність, проліферацію, морфогенез, а також експресію маркерних хондрогенних генів – *ACAN*, *COLII*, *GPC3*, *MGP*, *PTN*, *ANXA3*, *VIM* [40].

Матеріали та методи. *Реагенти.* У роботі використовували набори для виділення рибонуклеїнової кислоти (РНК) («Рибо-сорб» – «Амплі-Прайм»), для проведення класичної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) «PCR-core» («Gen-raq»), для проведення зворотної транскрипції «RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit» («Fermentas»), синтетичні праймери для проведення ПЛР («Fermentas»), агароза (Amrsc), Трілон-В («Riedel-de Haen»), Трис («Amresco»), етидіум бромід («Sigma»).

Отримання ЗТП. Для отримання ЗТП використовували самців віком 50 тижнів вагою 250–300 г. Кров тварин збирали, стабілізували гепарином, центрифугували при 900 г, отриману плазму центрифугували при 3000 г. Після центрифугування 2/3 верхньої частини плазми відкидали. Одразу після отримання ЗТП додавали в суспензійну культуру клітин пульпозного ядра. Кількість живих клітин ЗТП становила 95 %. Концентрація тромбоцитів у ЗТП дорівнювала $1,0-1,5 \times 10^{12}/л$.

Отримання суспензії клітин NP щура. Хвостовий відділ хребта щурів звільняли від шкіри та оболонки, промивали фізіологічним розчином з антибіотиком та антимікотиком 10 мкл/мл (РАА, Австрія). В стерильних умовах виділяли пульпозні ядра, суспендували їх у фізіологічному розчині шляхом механічного піпетування, центрифугували при 500 г 2 хв. Надосад центрифугували при 3000 г 5 хв. Клітини NP ресуспендували у поживному середовищі, що складалося з DMEM (Biowest, Франція), збагаченої 10%-ною сироваткою FBS (Biowest, Франція). Чисельність живих клітин (фарбування трипановим синім) складала $66 \pm 4,9 \%$.

Культивування клітин NP. Зразки для культивування містили $\sim 1,2 \times 10^6$ клітин NP. Культивування проводили у відповідності з методом [41], протягом 3, 7 та 14 діб в стандартних культуральних умовах (5 % CO_2 , 37 °C). Заміну

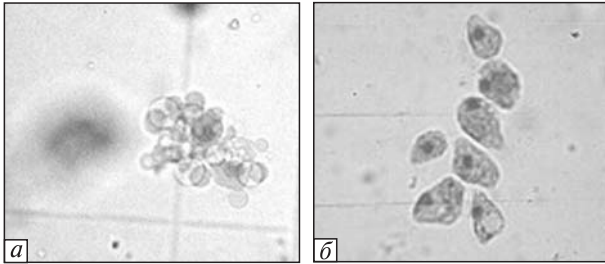


Рис. 1. Суспензія клітин NP. Забарвлення трипановим синім 40 × 10

поживного середовища здійснювали 1 раз на 3–4 доби. Контрольні зразки культивували 3, 7 та 14 діб без додавання ЗТП. В експериментальні культури ЗТП додавали з розрахунку, щоб тромбоцити склали 3, 10, 20 % від клітин NP у культуральному зразку. Для збереження концентрації тромбоцитів при заміні середовища кожний раз додавали відповідну їх кількість. Після культивування клітини зразків NP, що велись в одних умовах об'єднувались та підлягали дослідженню експресії хондрогенних генів.

Визначення експресії генів. Виділення РНК проводили стандартним методом з використанням набору «Рибо-сорб» («Amplisens») відповідно протоколу. Вихід та чистоту препарату РНК оцінювали за поглинанням проби при 260/280 нм.

Експресію генів *COL1I*, *ACAN*, *GPC3*, *ANX3*, *PTN*, *MGP*, *VIM* у культурі клітин NP хвостових хребців щурів визначали методом RT PCR.

Реакцію RT проводили з використанням набору «RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit» («Fermentas»). Як контрольний ген було використано ген гліцеральдегід-3-фосфат-де-

гідрогенази (*GAPDH*). ПЛР здійснювали з використанням ампліфікатора «Терцик» («ДНК-технологія») та набору для проведення класичної ПЛР «PCR-core» («Genpaq»).

Для визначення експресії генів використовували праймери:

COL1I: 5'-caccgctaacgtccagatgac-3', 5'-ggaaggcgtgaggtcttctgt-3';

ACAN: 5'-ccactggagaggactgcgtag-3', 5'-ggctctgcaagtgattcgag-3';

GPC3: 5'-ggccctgagccagtgggt-3', 5'-tttacccttgggcaagacat-3';

PTN: 5'-ctcagagatgaagatcccttgca-3', 5'-caagcctggaactgtatttgc-3';

VIM: 5'-gcaccctgcagtcattcaga-3', 5'-gcaaggattccactttacgttca-3';

ANX3: 5'-gtggaagagacgaaagcctgaa-3', 5'-atccgtgccatttttct-3';

MGP: 5'-gtccctctggccatcct-3', 5'-ttccatgcttctgtgattcata-3';

GAPDH: 5'-gggggctctctgctcctccc-3', 5'-caggcgtccgatacgccca-3'.

40 циклів ампліфікації було здійснено при температурі відпалу 60 °С.

Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі. Рівень експресії визначали за інтенсивністю електрофоретичних сигналів досліджуваних та контрольного (*GAPDH*) генів із використанням програмного забезпечення для аналізу зображень «ViTran». Нормалізацію даних інтенсивності електрофоретичних сигналів проводили по відношенню до інтенсивності відповідних сигналів *GAPDH*.

Статистичний аналіз. Показники експресії досліджуваної та контрольної груп порівнювали. Для визначення статистичною значу-

Таблиця 1. Життєздатність клітин NP щура в культурі під впливом ЗТП (% живих клітин)

Термін культивування	Контроль	Контроль, без ЗТП	ЗТП, 3 %	ЗТП, 10 %	ЗТП, 20 %
Після суспендування	66,0 ± 4,9	–	–	–	–
3 доба	–	28,0 ± 1,9	50,0 ± 3,5	65,0 ± 4,7	60,0 ± 4,2
P (t test)			0,0004	0,0001	0,0002
7 доба	–	30,0 ± 2,1	48,0 ± 3,1	65, ± 4,9	70,0 ± 5,2
P(t test)			0,0012	0,0001	0,0001
14 доба	–	27,0 ± 2,0	47,0 ± 3,0	67,0 ± 5,2	70,0 ± 5,5
P(t test)			0,0002	0,0001	0,00005

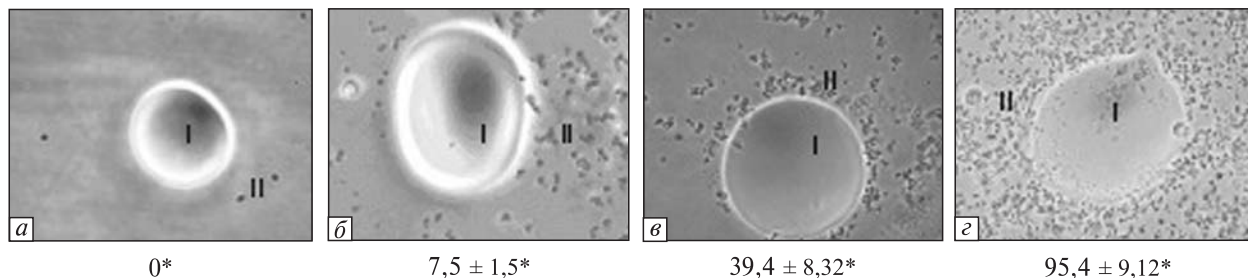


Рис. 2. Культура клітин NP із додаванням 3, 10, 20 % ЗТП 3 доба. Фазово-контрастна мікроскопія, живий незабарвлений препарат: а – контроль, 40 × 10; б – 3 % ЗТП, 40 × 10; в – 10 % ЗТП, 40 × 10; з – 20 % ЗТП, 40 × 10; I – хондробласт, II – тромбоцити. * – кількість тромбоцитів у зоні 10 % від діаметра клітини

щості різниці у показниках використовували парний *t*-test Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення.
Вплив 3, 10, 20 % PRP на морфобіологічні характеристики клітин NP щура. Суспензія клітин NP, отримана із хвостового відділу хребта щурів, складалася з поодиноких округлих клітин та агрегатів по 4–15 клітин, кількість живих клітин становила $\sim 66 \pm 4,9$ %. Живі клітини характеризувались округлою бластоподібною формою (рис. 1, а). Загиблі клітини мали здебільше полігональну форму, пікнотичну цитоплазму та децентралізоване положення ядра (рис. 1, б).

Дослідження життєздатності клітин NP щура при культивуванні з різними концентраціями ЗТП (3, 10 та 20 %) на різних термінах: 3, 7 та 14 діб (табл. 1) показало, що на 3 добу культивування вміст живих клітин в контрольних зразках (без ЗТП) знижувався до $28 \pm 1,9$ %. У культурах із ЗТП 3, 10, 20 % кількість живих клітин складала $50 \pm 3,5$, $65 \pm 4,7$ та $60 \pm 4,2$ % відповідно, що вище ніж у контрольних зразках у 1,8; ($p = 0,0004$); 2,3 ($p = 0,0001$); 2,1 ($p = 0,0002$) рази відповідно. На 7 добу в контрольних культуральних зразках фракція живих клітин залишалася без змін $30 \pm 2,1$ %. У групі із додаванням ЗТП 3, 10, 20 % їхня чисельність була значно вища: 48 ± 3 % ($p = 0,0012$); $65 \pm 4,9$ % ($p = 0,0001$); $70 \pm 5,2$ % ($p = 0,0001$) відповідно. На 14 добу культивування чисельність фракції живих клітин у контрольних зразках становила $27 \pm 2,0$, а в експериментальних в присутності ЗТП 3, 10, 20 % була значно вищою – $47 \pm 3,0$ % ($p = 0,0002$), $67 \pm 5,2$ % ($p = 0,0001$); $70 \pm 5,5$ % ($p = 0,00005$) відповідно. Рівень живих клітин на 7 та 14 добу культивування з ЗТП 10 та 20 %

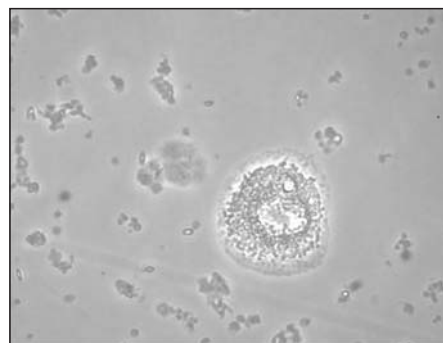


Рис. 3. Культура клітин NP із додаванням ЗТП 20 %, 7 доба фазово-контрастна мікроскопія, живий незабарвлений препарат; 20 × 10

статистично не відрізнявся від їхньої кількості у суспензії NP без культивування.

Спостереження за культурою показали тропність тромбоцитів до бластоподібних округлих клітин (рис. 2). Вони утворювали зону адгезії по периметру. Їхня кількість у зоні адгезії залежала від дози ЗТП. На 3 добу культивування кількість тромбоцитів у зоні адгезії при 10 % PRP була вища у 5,2 ($p = 0,0006$) рази, а при 20 % ЗТП у 12,7 ($p = 0,00003$) разів порівняно з культурами із ЗТП 3 % (рис. 2). На 7 добу культивування шар тромбоцитів навколо живих клітин ставав більш щільним залежно від концентрації ЗТП, подекуди спостерігали їхню агрегацію на поверхні клітини (рис. 3). На 14 добу культивування з 20 % ЗТП клітини NP змінювали форму – ставали овальними, веретеноподібними, полігональними, у деяких випадках з'являлись відростки (рис. 4, з, д). Спостерігали клітини на стадії ділення (рис. 4, в). Навколо хондроцитоподіб-

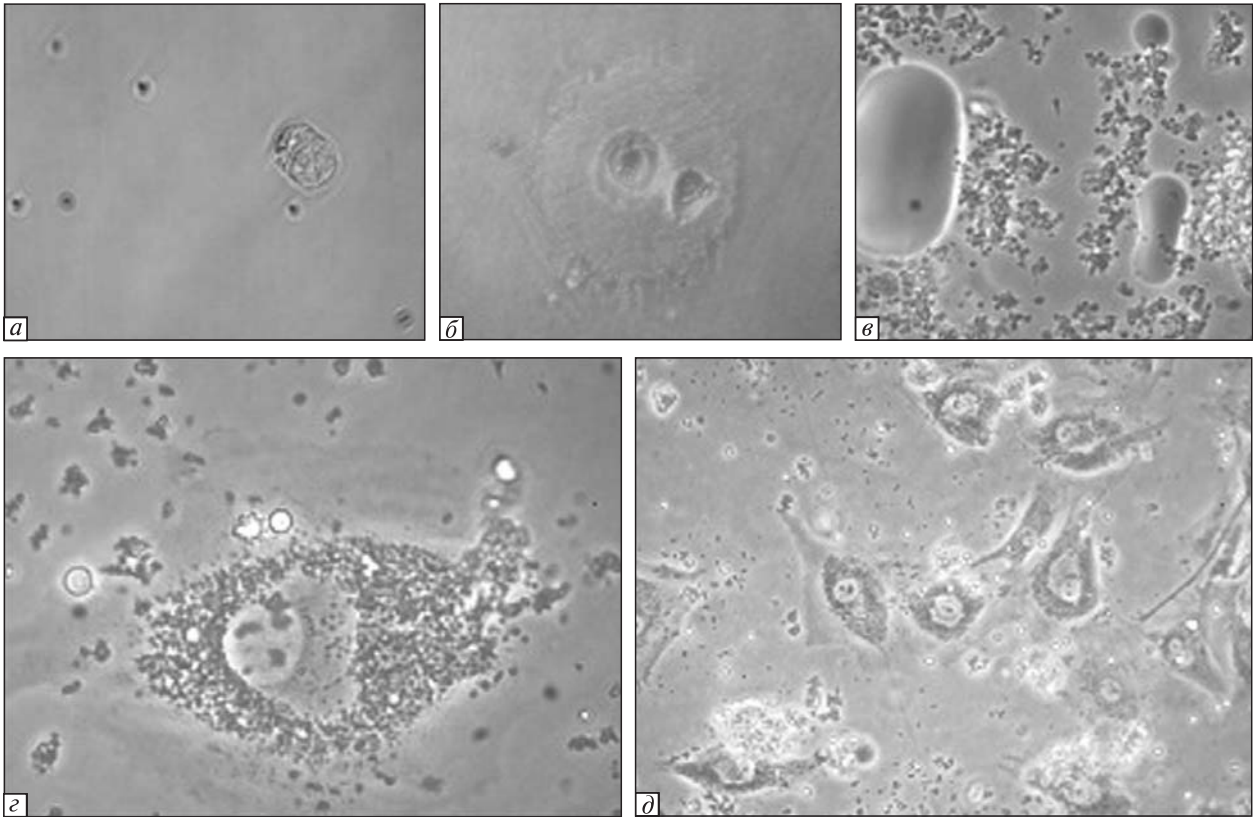


Рис. 4. Культура клітин NP, фазово-контрастна мікроскопія, живий незабарвлений препарат *a, б* – контроль *a* – 10×10 , *б* – 10×10 ; *в, г, д* – із додаванням 20 % ЗТП, 40×10 ; *в* – хондробласт на стадії ділення; *г, д* – хондроцити, диференціювання, адгезія тромбоцитів

них клітин зберігався щільний шар тромбоцитів (рис. 4, *д*). У контрольних зразках подібних змін не спостерігали (рис. 4, *а, б*).

Дослідження експресії хондрогенних маркерних генів у клітинах NP. Експресія генів хондрогенних маркерів в суспензії клітин NP шура на 3 добу культивування без додавання ЗТП знижувалась порівняно з експресією відповідних генів клітинами NP без культивування у 1,3–34 рази, а експресія гена *MGP* використаним методом дослідження не детектувалась (рис. 5). На 7 та 14 добу культивування спостерігали подальше зниження експресії всіх досліджуваних генів у 1,5–4,6 разів та 2,2–7,2 рази відповідно. Експресія генів – *COLII*, *PTN* та *MGP* на 7 добу, а *COLII*, *ACAN*, *GPC3*, *PTN* та *MGP* на 14 добу – використаним методом дослідження не детектувалась (рис. 5).

При додаванні ЗТП 3 % в культуральне середовище на 3 добу культивування спостері-

гали запобігання зниженню експресії *COLII*, *ANXA3*, *GPC3*, *PTN* порівняно зі зразками без додавання ЗТП (рис. 6). Спостерігали підвищення експресії гена *VIM* у 1,8 разів ($P = 0,0001$) та відновлення детектування експресії гена *MGP*. Однак рівень експресії гена *ACAN* знижується у 1,6 разів ($P = 0,02$).

Додавання ЗТП у концентрації 10 % на 3 добу у порівнянні зі зразками без додавання ЗТП сприяє зростанню експресії генів більш виразно: *COLII* у 1,7 разів ($P = 0,005$); *VIM* у 1,8 разів ($P = 0,0006$); *ANXA3* у 1,4 рази ($P = 0,001$). Підтримується експресія гена *MGP*. Рівень експресії генів *GPC3*, *PTN* відповідає таким у культурах без ЗТП, а рівень експресії гена *ACAN* знижується у 1,4 рази ($P = 0,02$).

При додаванні у культуральне середовище ЗТП 20 % на 3 добу культивування спостерігали зростання експресії більшості досліджуваних генів: *COLII* у 2,9 разів ($P = 0,002$); *VIM*

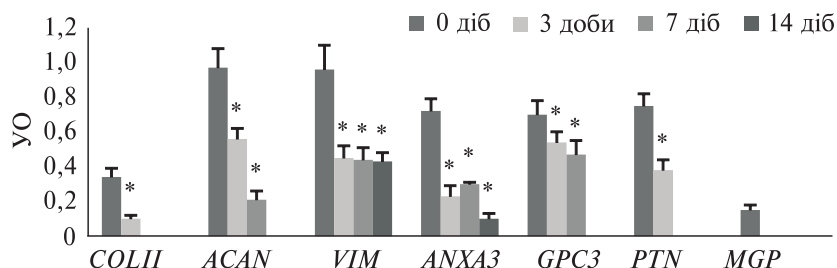


Рис. 5. Експресія хондрогенних генів в культурі клітин NP на 3, 7 та 14 добу культивування без додавання ЗТП у порівнянні з нативною суспензією NP (0 дів культивування). YO – умовні одиниці. * – $P < 0,05$ (парний t-test Стьюдента)

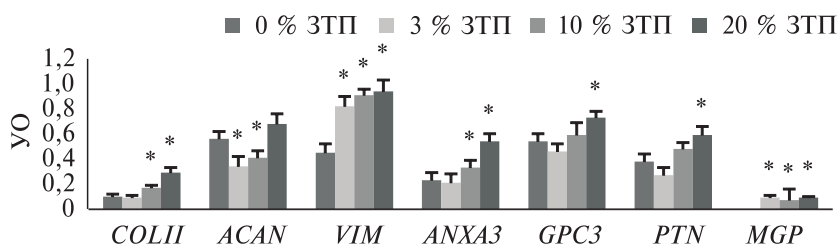


Рис. 6. Експресія хондрогенних генів в культурі клітин NP на 3 добу культивування з додаванням 3, 10 та 20 % ЗТП у порівнянні з культурою клітин NP на 3 день культивування без додавання ЗТП. YO – умовні одиниці. * – $P < 0,05$ (парний t-test Стьюдента)

у 2,1 рази ($P = 0,0003$); *ANXA3* у 2,3 рази ($P = 0,0003$); *GPC* у 1,4 рази ($P = 0,0011$); *PTN* у 1,6 рази ($P = 0,0017$) разів; визначалась експресія гена *MGP*, спостерігали тенденцію до зростання експресії гена *ACAN* у 1,2 рази ($P = 0,0606$).

Подальше культивування клітин NP шурів з додаванням у культуральне середовище 20 % ЗТП, як найефективнішої, протягом 7 и 14 дів демонструє запобігання зниженню експресії всіх досліджуваних генів порівняно з відповідним строком культивування без ЗТП (табл.

2). На сьомий день культивування в зразках з 20 % ЗТП зберігається експресія генів *COL1I*, *PTN*, *MGP* на відміну від культур без ЗТП. Експресія генів *ACAN*, *VIM*, *ANXA3*, *GPC3* у зразках з 20 % ЗТП вища у 1,8; 2,0; 1,3; 1,2 рази відповідно. На 14 добу культивування зберігається експресія генів *COL1I*, *ACAN*, *GPC3*, *PTN*, *MGP*, а *VIM* та *ANXA3* вища у 2 та 6,4 рази відповідно.

Висновки. Тромбоцити в культуральних зразках демонструють тропність до округлих бла-

Таблиця 2. Експресія хондрогенних генів в суспензії клітин NP на 7 та 14 добу культивування з 20 % ЗТП

Ген	7 доба культивування		14 доба культивування	
	контроль без ЗТП	+ 20 % ЗТП	контроль без ЗТП	+ 20 % ЗТП
<i>COL1I</i>	НД	0,03 + 0,003	НД	0,03 + 0,01
<i>ACAN</i>	0,21 + 0,055	0,38 + 0,057 ($P = 0,000$)*	НД	0,5 + 0,04
<i>VIM</i>	0,44 + 0,066	0,88 + 0,083 ($P = 0,0001$)*	0,43 + 0,073	0,84 + 0,08 ($P = 0,001$)*
<i>ANXA3</i>	0,03 + 0,01	0,40 + 0,038 ($P = 0,0000$)*	0,11 + 0,03	0,64 + 0,083 ($P = 0,000$)*
<i>GPC3</i>	0,47 + 0,081	0,57 + 0,063 ($P = 0,08$)*	НД	0,27 + 0,05
<i>PTN</i>	НД	0,45 + 0,032	НД	0,5 + 0,04
<i>MGP</i>	НД	0,15 + 0,014	НД	0,23 + 0,06

Примітка. НД – не детектується. * – $P < 0,05$ (парний t-test Стьюдента).

стоподібних клітин NP щура, формують зону адгезії. ЗТП у концентраціях 3, 10, 20 % на різних строках культивування дозозалежно підвищує життєздатність клітин NP. При використанні 20 % ЗТП на 14 добу культивування спостерігали диференціювання blastopodібних клітин та клітини на стадії ділення. Культивування NP щура в стандартних умовах без додавання ЗТП призводить до поступового зниження експресії хондрогенних маркерних генів: на 3 добу культивування у 1,3–3,4 рази, на 7 добу – 1,5–4,6 разів, на 14 добу експресія маркерних генів *VIM*, *ANXA3* знижується у 2,2 та 7,2 рази відповідно, а експресія *COLII*, *ACAN*, *GPC3*, *PTN* та *MGP* використаним методом дослідження не детектується. Культивування з ЗТП дозозалежно запобігає зниженню експресії хондрогенних маркерних генів порівняно з культивуванням без ЗТП. Три доби культивування з 3 % ЗТП запобігає зниженню експресії генів *COLII*, *ANXA3*, *GPC3*, *PTN*, сприяє відновленню детектування експресії гена *MGP* та підвищенню експресії гена *VIM* у 1,8 разів. Три доби культивування з ЗТП 10 % запобігає зниженню експресії генів *GPC3*, *PTN*, сприяє зростанню експресії генів *COLII*, *VIM*, *ANXA3* у 1,4–2,0 рази, підтримує експресію *MGP*. Три доби культивування з ЗТП 20 % призводить до зростання експресії досліджуваних генів у 1,2–2,9 рази. Подальше культивування клітин NP (7, 14 діб) у присутності 20 % ЗТП запобігає зниженню експресії всіх досліджуваних генів. Таким чином, в умовах експерименту ЗТП має дозозалежний анаболічний вплив на клітини NP щура: запобігає загибелі клітин та зниженню експресії хондрогенних маркерних генів.

EFFECT OF PLATELET RICH PLASMA ON MORPHOGENESIS AND CHONDROGENIC MARKER GENE EXPRESSION BY CHONDROCYTE-LIKE RAT NUCLEUS PULPOSUS CELLS IN VITRO

E.G. Pedachenko, I.G. Vasilyeva, M.V. Khizniak, N.G. Chopuyck, N.P. Oleksenko, I.N. Shuba, O.I. Tsjubko, O.S. Galanta, A.B. Dmytrenko, T.A. Makarova, N.D. Snitsar

SI «Institute of Neurosurgery n.a. Acad. A. Romodanov», AMS of Ukraine
32, Platona Mayborody Str., 04050, Kyiv, Ukraine

E-mail: pedach@i.ua, vigvasileva@gmail.com, Khyzhnyak63@gmail.com, natalia.chopuyck@gmail.com, n.oleksenko@gmail.com, irina_shuba@ukr.net,

tsjubkoolga@gmail.com, lenagalanta@gmail.com, 1866600@online.ua, tatyana.makarova77799@gmail.com, angelikdmiz.bor@gmail.com

The purpose was to study the effect of 3, 10 and 20 % rat platelet rich plasma (PRP) on the morphobiologic characteristics of chondrocyte-like rat *nucleus pulposus* (NP) cells, and also expression of chondrogenic genes: *ACAN*, *COLII*, *GPC3*, *MGP*, *PTN*, *ANXA3*; *VIM in vitro*. The viability of rat NP cells in culture is dose-dependently enhanced by 3, 10, 20 % PRP. Platelets in cultures show tropicity to blast-like cells, form an adhesion zone. When 20 % PRP are used at the 14th day of cultivation, the blast-like cells are differentiated, the cells are recorded at the stage of division. The decreased expression of chondrogenic genes is dose-dependently prevented by PRP. More effective was 20 % PRP. In these cultures, an increase in the expression of most studied chondrogenic genes was observed: 2,9 times higher for *COLII* ($P = 0,002$); 2,1 times higher for *VIM* ($P = 0,0003$); 2,3 times higher for *ANXA3* ($P = 0,0003$); 1,4 times higher for *GPC3* ($P = 0,0011$); 1,6 times higher for *PTN* ($P = 0,0017$), 1,2 times higher for *ACAN* ($P = 0,0606$).

ВЛИЯНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ НА МОРФОГЕНЕЗ И ЭКСПРЕССИЮ ХОНДРОГЕННЫХ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ ХОНДРОЦИТОПОДОБНЫМИ КЛЕТКАМИ NUCLEUS PULPOSUS КРЫСЫ IN VITRO

Е.Г. Педаченко, И.Г. Васильева, М.В. Хижняк, Н.Г. Чопик, Н.П. Олексенко, И.Н. Шуба, О.И. Цюбко, Е.С. Галанта, Т.А. Макарова, А.Б. Дмитренко, Н.Д. Снитсар

Целью данной работы было изучить влияние 3, 10, 20 % обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) крысы на морфобиологические характеристики хондроцитоподобных клеток *nucleus pulposus* (NP) крысы, а также экспрессию хондрогенных генов *ACAN*, *COLII*, *GPC3*, *MGP*, *PTN*, *ANXA3*; *VIM in vitro*. ОТП 3, 10, 20 % дозозависимо повышает жизнеспособность клеток NP крысы в культуре. Тромбоциты в культурах демонстрируют тропность к blastopodобным клеткам, формируют зону адгезии. При использовании ОТП 20 % на 14 сутки культивирования наблюдается дифференцировка blastopodобных клеток, регистрируются клетки на стадии деления. ОТП дозозависимо предотвращает снижение экспрессии хондрогенных генов. Более эффективной была ОТП 20 %. В этих культурах наблюдалось увеличение экспрессии большинства исследованных хондрогенных генов: *COLII* в 2,9 ($P = 0,002$); *VIM* в 2,1 ($P = 0,0003$); *ANXA3* в 2,3 ($P = 0,0003$); *GPC3* в 1,4 ($P = 0,0011$); *PTN* в 1,6 ($P = 0,0017$); *ACAN* в 1,2 ($P = 0,0606$) раза.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Daly, C., Ghosh, P., Jenkin, G., Oehme, D., and

- Goldschlager, T., A Review of Animal Models of Intervertebral Disc Degeneration: Pathophysiology, Regeneration, and Translation to the Clinic, *Bio-med. Res. Int.*, 2016, 2016:5952165. doi: 10.1155/2016/5952165.
2. Anitua, E., Padilla, S., Biologic therapies to enhance intervertebral disc repair, *Regen. Med.*, 2018, vol. 13, no. 1, pp. 55–72. doi: 10.2217/rme-2017-0111.
 3. Fernandes, G., Yang, S., Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering, *Bone Res.*, 2016, vol. 4, pp. 16036. doi:10.1038/boneres.2016.36.
 4. Wang, S, Fan, W, Jia, J, Ma, L, Yu, J, and Wang, C., Is exclusion of leukocytes from platelet-rich plasma (PRP) a better choice for early intervertebral disc regeneration?, *Stem Cell Res. Therapy*, 2018, vol. 9, pp. 199. doi:10.1186/s13287-018-0937-7.
 5. Oloff, L., Elmi, E., Nelson, J., and Crain, J., Retrospective Analysis of the Effectiveness of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Achilles Tendinopathy: Pretreatment and Posttreatment Correlation of Magnetic Resonance Imaging and Clinical Assessment, *Foot Ankle Spec.*, 2015, vol. 8, no. 6, pp. 490–7. doi: 10.1177/1938640015599033.
 6. Gosens, T., Peerbooms, J.C., van Laar, W., and den Ouden, B.L., Ongoing positive effect of platelet-rich plasma versus corticosteroid injection in lateral epicondylitis: A double-blind randomized controlled trial with 2-year follow-up, *Am. J. Sports Med.*, 2011, vol. 39, no. 6, pp. 1200–8. doi: 10.1177/0363546510397173.
 7. Laver, L., Marom, N., Dnyanesh, L., Mei-Dan, O., Espregueira-Mendes, J., and Gobbi A., PRP for Degenerative Cartilage Disease: A Systematic Review of Clinical Studies, *Cartilage*, 2017, vol. 8, no. 4, pp. 341–64. doi: 10.1177/1947603516670709.
 8. Kon, E., Buda, R., Filardo, G., Di Martino, A., Timoncini, A., Cenacchi, A., Fornasari, P.M., Gianini, S., and Marcacci, M., Platelet-rich plasma intraarticular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*, 2010, vol. 18, no. 4, pp. 472–9. doi:10.1007/s00167-009-0940-8.
 9. Kon, E., Filardo, G., Delcogliano, M., Presti, M.L., Russo, A., Bondi, A., Di Martino, A., Cenacchi, A., Fornasari, P.M., and Marcacci, M., Platelet-rich plasma: New clinical application: A pilot study for treatment of jumper's knee, *Injury*, 2009, vol. 40, no. 6, pp. 598–603. doi: 10.1016/j.injury.2008.11.026.
 10. Vannini, F., Di Matteo, B., and Filardo, G., Platelet-rich plasma to treat ankle cartilage pathology – from translational potential to clinical evidence: a systematic review, *J. Exp. Orthopaedics*, 2015, vol. 2, pp. 2. doi.org/10.1186/s40634-015-0019-z.
 11. Louis, M., Magalon, J., Jouve, E., Bonet, C.E., Mattei, J.C., Chagnaud, C., Rochewerger, A., Veran, J., and Sabatier, F., Growth Factors Levels Determine Efficacy of Platelets Rich Plasma Injection in Knee Osteoarthritis: A Randomized Double Blind Noninferiority Trial Compared With Viscosupplementation, *Arthroscopy, J. Arthrosc. Rel. Surgery*, 2018, vol. 34, no. 5, pp. 1530–40. doi: 10.1016/j.arthro.2017.11.035.
 12. Macaulay, I.C., Carr, P., Gusnanto, A., Ouwehand, W.H., Fitzgerald, D., and Watkins, N.A., Platelet genomics and proteomics in human health and disease, *J. Clin. Invest.*, 2005, vol. 115, no. 12, pp. 3370–7. doi: 10.1172/JCI26885.
 13. García, B., Platelet clinical proteomics: Facts, challenges, and future perspectives. *Proteomics Clin. Appl.*, 2016, vol. 10, no. 8, pp. 767–73. doi: 10.1002/prca.201500125.
 14. Fortier, L.A., Barker, J.U., Strauss, E.J., McCarrrel, T.M., and Cole B.J., The Role of Growth Factors in Cartilage Repair, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 2011, vol. 469, no. 10, pp. 2706–15. doi:10.1007/s11999-011-1857-3.
 15. Dolder, J., Mooren, R., Vloon, A., Stoelinga, P., and Jansen, J., Platelet-Rich Plasma: Quantification of Growth Factor Levels and the Effect on Growth and Differentiation of Rat Bone Marrow Cells, *Tissue Engineering*, 2006, vol. 12, no. 11, pp. 3067–73. doi: 10.1089/ten.2006.12.3067.
 16. Jalowiec, J.M., D'Este, M., Bara, J.J., Denom, J., Menzel, U., Alini, M., Verrier, S., and Herrmann, M., An In Vitro Investigation of Platelet-Rich Plasma-Gel as a Cell and Growth Factor Delivery Vehicle for Tissue Engineering, *Tis. Engin. Part C, Methods*, 2016, vol. 22, no. 1, pp. 49–58. doi: 10.1089/ten.tec.2015.0223.
 17. Fioravanti, C., Frustaci, I., Armellini, E., Condo, R., Arcuri, C., and Cerroni, L., Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors, *Oral. Implant.*, 2015, vol. 8, no. 4, pp. 96–113. doi:10.11138/orl/2015.8.4.096.
 18. Akeda, K., An, H., Okuma, M., Attawia, M., Miyamoto, K., Thonar, E.G., Lenz, M.E., Sah, R.L., and Masuda, K., Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis, *Osteoarthr. Cartil.*, 2006, vol. 14, no. 12, pp. 1272–80. doi: 10.1016/j.joca.2006.05.008.
 19. Spreafico, A., Chellini, F., Frediani, B., Bernardini, G., Nicolini, S., Serchi, T., Collodel, G., Paffetti, A., Fossombroni, V., Galeazzi, M., Marcolongo, R., and Santucci, A., Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes, *J. Cell Biochem.*, 2009, vol. 108, no. 5, pp. 1153–65. doi: 10.1002/jcb.22344.
 20. Hildner, F., Eder, M.J., Hofer, K., Aberl, J., Redl, H., van Griensven, M., Gabriel, C., and Peterbauer-Scherb, A., Human platelet lysate successfully promotes proliferation and subsequent chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells: a com-

- parison with articular chondrocytes, *Tis. Eng. Regen. Med.*, 2015, vol. 9, no. 7, pp. 808–18. doi: 10.1002/term.1649.
21. Gaissmaier, C., Fritz, J., Krackhardt, T., Flesch, I., Aicher, W., and Ashammakhi, N., Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures, *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 14, pp. 1953–60. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.031.
 22. Muraglia, A., Nguyen, V.T., Nardini, M., Moggi, M., Coviello, D., Dozin, B., Strada, P., Baldelli, I., Formica, M., Cancedda, R., and Mastrogiacomo, M., Culture Medium Supplements Derived from Human Platelet and Plasma: Cell Commitment and Proliferation Support, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2017, vol. 5, pp. 66. doi: 10.3389/fbioe.2017.00066
 23. Chien, C., Ho, H., Liang, Y., Ko, P., Sheu, M., and Chen, C., Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage, *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Appl. Biomater.*, 2012, vol. 100B, no. 4, pp. 948–55. doi: 10.1002/jbm.b.32657.
 24. Zhou, Z., Yu, H., Wang, Y., Guo, Q., Wang, L., and Zhang, H., ZNF606 interacts with Sox9 to regulate chondrocyte differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, vol. 479, no. 4, pp. 920–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.048.
 25. Xu, C., Zhu, S., Wu, M., Han, W., and Yu, Y., Functional Receptors and Intracellular Signal Pathways of Midkine (MK) and Pleiotrophin (PTN), *Biol. Pharmac. Bull.*, 2014, vol. 37, no. 4, pp. 511–20.
 26. Vo, N.V., Hartman, R.A., Patil, P.R., Risbud, M.V., Kletsas, D., Iatridis, J.C., Hoyland, J.A., Le Maitre, C.L., Sowa, G.A., and Kang, J.D., Molecular Mechanisms of Biological Aging in Intervertebral Discs, *J. Orthop. Res.*, 2016, vol. 34, no. 8, pp. 1289–306. doi: 10.1002/jor.23195.
 27. Ngo, K., Patil, P., McGowan, S.J., Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., Kang, J., Sowa, G., and Vo, N., Senescent intervertebral disc cells exhibit perturbed matrix homeostasis phenotype, *Mech. Ageing. Dev.*, 2017, vol. 166, pp. 16–23. doi: 10.1016/j.mad.2017.08.007.
 28. Ngo, K., Patil, P., McGowan, S.J., Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., Kang, J., Sowa, G., and Vo, N., Current strategies for treatment of intervertebral disc degeneration: substitution and regeneration possibilities, *Biomater. Res.*, 2017, vol. 21, pp. 22. doi: 10.1186/s40824-017-0106-6.
 29. Vynios, D.H., Metabolism of Cartilage Proteoglycans in Health and Disease, *Biomed. Res. Int.*, 2014, 2014:452315. doi: 10.1155/2014/452315.
 30. Neill, T., Schaefer, L., and Iozzo, R.V., Decoding the matrix: Instructive roles of proteoglycan receptors, *Biochem.*, 2015, vol. 54, no. 30, pp. 4583–98. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00653.
 31. Chen, S., Fu, P., Wu, H., and Pei M., Meniscus, articular cartilage, and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development, and function, *Cell Tis. Res.*, 2017, vol. 370, no. 1, pp. 53–70. doi: 10.1007/s00441-017-2613-0.
 32. Rodrigues-Pinto, R., Richardson, S., and Hoyland, J., Identification of novel nucleus pulposus markers, *Bone Joint Res.*, 2013, vol. 2, no. 8, pp. 169–78. doi: 10.1302/2046-3758.28.2000184.
 33. Tapp, H., Hernandez, D., Neame, P., and Koob, T., Pleiotrophin inhibits chondrocyte proliferation and stimulates proteoglycan synthesis in mature bovine cartilage, *Matrix Biol.*, 1999, vol. 18, no. 6, pp. 543–56.
 34. Lee, C., Sakai, D., Nakai, T., Toyama, K., Mochida, J., Alini, M., and Grad, S., A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat, *Europ. Spine J.*, 2007, vol. 16, no. 12, pp. 2174–85. doi: 10.1007/s00586-007-0475-y.
 35. Schloer, S., Pajonczyk, D., and Rescher, U., Annexins in Translational Research: Hidden Treasures to Be Found, *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19, no. 6, pp. 1781. doi: 10.3390/ijms19061781.
 36. Luo, G., Ducy, P., McKee, M., Pinero, G.J., Loyer, E., Behringer, R.R., and Karsenty, G., Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein, *Nature*, 1997, vol. 386, no. 6620, pp. 78–81. doi: 10.1038/386078a0.
 37. Illien-Jünger, S., Torre, O.M., Kindschuh, W.F., Chen, X., Laudier, D.M., and Iatridis J.C., Ages induce ectopic endochondral ossification in intervertebral discs, *Eur. Cell Mater.*, 2016, vol. 18, no. 32, pp. 257–70. doi: 10.22203/eCM.v032a17.
 38. Fontes, R.B., Baptista, J.S., Rabbani, S.R., Traynelis, V.C., and Liberti E.A., Structural and Ultrastructural Analysis of the Cervical Discs of Young and Elderly Humans, *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 10, e0139283. doi: 10.1371/journal.pone.0139283.
 39. Newman, B., Gigout, L., Sudre, L., Grant, M., and Wallis, G., Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival, *J. Cell Biol.*, 2001, vol. 154, no. 3, pp. 659–66. doi: 10.1083/jcb.200106040.
 40. Lv, F., Leung, V.Y., Huang, S., Huang, Y., Sun, Y., and Cheung, K.M., In search of nucleus pulposus-specific molecular markers, *Rheumatol. (Oxford)*, 2014, vol. 53, no. 4, pp. 600–10. doi: 10.1093/rheumatology/ket303.
 41. Lee, H., Shon, O., Park, S., Kim, H.J., Kim, S., Ahn, M.W., and Do, S.H., Platelet-Rich Plasma Increases the Levels of Catabolic Molecules and Cellular Dedifferentiation in the Meniscus of a Rabbit Model, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, no. 1, pp. 120. doi: 10.3390/ijms17010120.

Надійшла в редакцію 05.06.18
Після доопрацювання 09.10.18
Прийнята до друку 18.03.19