

Є. Г. Педаченко, М. В. Хижняк, І. Г. Васильєва, Н. Г. Чопик, Ю. Є. Педаченко,
Н. П. Олексенко, І. М. Шуба, О. С. Галанта, О. І. Цюбко

Державна установа “Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України”, 04050 Київ

ВПЛИВ РІЗНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТРОМБОЦИТІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ НА ХОНДРОГЕНЕЗ КЛІТИН ПУЛЬПОЗНОГО ЯДРА ЩУРІВ *IN VITRO*

Метою даного дослідження було вивчення впливу збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) різної концентрації на хондрогенні властивості клітин пульпозного ядра щурів на основі оцінки їх життєздатності та експресії генів хондрогенних маркерів. Культивування проводили протягом 3 діб; контрольні зразки культивували без додавання ЗТП; в експериментальні культури додавали ЗТП з розрахунку, щоб тромбоцити складали 3 %, 10 %, 20 % та 30 % від концентрації клітин пульпозного ядра у культуральному зразку. Встановлено, що внесення збагаченої тромбоцитами плазми в культуру клітин пульпозного ядра дозозалежно сприяє збереженню життєздатності клітин та експресії генів хондрогенних маркерів (колагену, анексіну, агрекану, віментину, гліпікану, плеотрофіну, матричного протеїну *gla*). Найбільш ефективними виявилися препарати ЗТП 20 % та 30 %. Отримані дані вказують на перспективність застосування збагаченої тромбоцитами плазми при лікуванні патологій хребта, зокрема, його дегенеративних та травматичних уражень.

Ключові слова: збагачена тромбоцитами плазма, культивування клітин, пульпозне ядро, експресія генів.

Дегенеративні процеси в міжхребцевих дисках (МХД), які є частою причиною дистрофічних та травматичних уражень хребта, асоціюються насамперед з біохімічними та морфологічними змінами в пульпозному ядрі (ПЯ), а саме, з прогресуючою втратою ним протеогліканів, води та колагену, і, як наслідок, зі змінами біомеханічних властивостей ураженого хребцево-рухового сегмента хребта [3]. Загальновідомі методи лікування уражень хребта спрямовані на ліквідацію лише окремих симптомів захворювання і не забезпечують можливості усунення патологічних змін, що викликають послі-

довне ураження більшої частини міжхребцевих дисків. Тому важливого значення набуває розробка методів відновлення структурно-функціональних властивостей уражених анатомічних структур МХД, зокрема, методів регенеративної медицини, яка базується на використанні новітніх клітинних технологій [10, 11, 19].

Важливим етапом у розвитку регенеративної медицини стало створення та застосування ін'єкційної форми тромбоцитарної аутоплазми — збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) [1]. Дана методика знайшла широке застосування в різних об-

Є. Г. Педаченко — директор Інституту, академік НАМН

Відділення малоінвазивної і лазерної спінальної нейрохірургії

М. В. Хижняк — зав. відділенням, д.м.н., професор

Ю. Є. Педаченко — лікар-нейрохірург, професор кафедри НМАПО, д.м.н.

Відділ нейробіохімії

І. Г. Васильєва — нач. відділу, к.б.н.

Н. Г. Чопик — пров.н.с., к.б.н. (natalia.chopyck@gmail.com)

Н. П. Олексенко — с.н.с.

І. М. Шуба — с.н.с.

О. С. Галанта — н.с.

О. І. Цюбко — н.с.

© Є. Г. Педаченко, М. В. Хижняк, І. Г. Васильєва, Н. Г. Чопик, Ю. Є. Педаченко, Н. П. Олексенко, І. М. Шуба, О. С. Галанта, О. І. Цюбко, 2018.

ластях медицини. Але тривалий час ці повідомлення мали спорадичний характер, і тільки в останні роки почалися системні дослідження властивостей ЗТП та ефектів її застосування в різних сферах [9, 12, 16].

Участь тромбоцитів у процесах репарації опосередковується факторами росту та біологічно активними речовинами (адгезивними протеїнами, фібринолітичними факторами, протеазами та ін.), які містяться в α -гранулах, що виділяються при активації тромбоцитів, як правило, в першу годину після пошкодження ендотелію, і синтез яких ще підтримується протягом тижня [17]. Серед основних факторів росту тромбоцитів виділяють: *TGF- β* — трансформуючий фактор росту β , *PDGF* — фактор росту тромбоцитів, *IGF* — інсуліноподібні фактори росту I та II типів, *FGF* — фактор росту фібробластів, *EGF* — фактор росту епідермісу, *VEGF* — фактор росту ендотелію судин [4].

Автори численних на сьогоднішній день робіт з дослідження властивостей тромбоцитарної аутоплазми дійшли висновку, що ЗТП посилює проліферацію мезенхімальних стовбурових клітин, хондробластів; проте існують розбіжності отриманих даних щодо здатності диференціювання клітин під впливом факторів росту тромбоцитів. При цьому, результати більшості проведених досліджень свідчать про посилюючий потенціал ЗТП на експресію хондрогенних генів, а також на продукування протеоглікану та колагену II типу [7, 8, 18]. Розбіжності можуть бути пов'язані як з різними препаратами ЗТП, зокрема це стосується варіабельності концентрації тромбоцитів в препараті, відмінності методики отримання препарату, так і з різними способами застосування препарату (кратність та частота введення, місце ін'єкцій).

Проведення досліджень з використанням системи *in vitro* з метою розробки та впровадження у клінічну практику новітніх клітинних технологій для лікування хворих з дегенеративними та травматичними ураженнями хребта є корисним та ефективним способом вивчення властивостей клітинних препаратів та підбору оптимальних умов їх застосування.

Метою даного дослідження було вивчення впливу збагаченої тромбоцитами плазми різної концентрації на хондрогенні властивості клітин пульпозного ядра щурів на основі оцінки їх життєздатності та експресії генів хондрогенних маркерів.

Матеріали та методи дослідження

Отримання ЗТП. Для отримання ЗТП використовували щурів-самців віком 50 тижнів масою тіла 250–300 г. Кров тварин збирали, стабілізували гепарином, центрифугували при 900g, отриману

плазму центрифугували при 3000g. 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 становила $1,0-1,5 \cdot 10^{12}/л$.

Отримання суспензії клітин ПЯ 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 500g 2 хв. Надсад центрифугували при 3000g 5 хв. Клітини ПЯ ресуспендували у поживному середовищі, що складалося з *DMEM* ("Biowest", Франція), збагаченої 10 % сироваткою *FBS* ("Biowest"). Чисельність живих клітин (фарбування трипановим синім) становила $(66 \pm 4,9) \%$.

Культивування клітин ПЯ. Зразки для культивування містили $\sim 1,2 \cdot 10^6$ клітин ПЯ. Культивування проводили протягом 3 діб в стандартних культуральних умовах в інкубаторі EC-160 ("Nüve", Турція) ($t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, вміст CO_2 — 5 %, вологість — 95 %). Контрольні зразки культивували без додавання ЗТП. В експериментальні культури ЗТП додавали з розрахунку, щоб тромбоцити становили 3 %, 10 %, 20 % та 30 % від клітин ПЯ у культуральному зразку. По закінченні терміну культивування проводили аналіз життєздатності клітин та кріоконсервацію зразків для подальших молекулярно-генетичних досліджень.

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

Експресію генів колагену II (*col II*), агрекану (*acan*), гліпікану (*gpc3*), анексину (*anx3*), плеотрофіну (*ptn*), матричного протеїну *gla* (*mgp*) та віментину (*vim*) в культурі клітин ПЯ хвостових хребців щурів визначали методом ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Реакцію ЗТ проводили з використанням набору "RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit" ("Fermentas"). В якості контрольного гена було використано ген гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогенази (*GAPDH*). ПЛР здійснювали з використанням ампліфікатора "Терцик" ("ДНК-технологія") та набору для проведення класичної ПЛР "PCR-core" ("GENPAQ").

Для визначення експресії генів використовували такі праймери: для гена *col II*: 5'-CACCGCTAACGTCCAGATGAC-3' та 5'-GGAAGGCGTGAGGTCTTCTGT-3', *acan*, *aggrecan-1*: 5'-CCACTGGAGAGACTGCGTAG-3' та 5'-

GGTCTGTGCAAGTGATTTCGAG-3' [15], *gpc3*: 5'-GGCCCTGAGCCAGTGGTT-3' та 5'-TTTACCCTTGGGCACAGACAT-3', *ptn*: 5'-STCAGAGATGTAAGATCCCTTGCA-3' та 5'-CAAGCCTGGAAGTGGTATTTGC-3', *vim*: 5'-GCACCCTGCAGTCATTCAGA-3' та 5'-GCAAGGATTCCACTTTACGTTCA-3', *anx3*: 5'-GTGGAAGAGACGAAAGCCTGAA-3' та 5'-ATCCGTGCCCATTTTTTCT-3', *mgp*: 5'-GCTCCCTCTGGCCATCCT-3' та 5'-TTCCATGCTTTCGTGAGATTCATA-3' [13], *GAPDH*: 5'-GGGGGCTCTCTGCTCCTCCC-3' та 5'-CAGGCGTCCGATACGGCCAA-3' [5]. 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 контрольних генів із використанням програмного забезпечення для аналізу зображень "ViTran". Нормалізацію даних інтенсивності електрофоретичних сигналів проводили по відношенню до інтенсивності відповідних сигналів *GAPDH*.

Для визначення статистичної значущості різниці у показниках досліджуваної та контрольної груп використовували парний *t*-test Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Першим кроком експериментальних досліджень було отримання препарату збагаченої тромбоцитами плазми крові щурів за методом двоетапного центрифугування, описаним вище. В отриманому препараті ЗТП концентрація тромбоцитів становила 1,0-1,5 млн/мкл, життєздатність клітин становила 95 %. Отриманий препарат зразу ж додавали в культуру клітин пульпозного ядра для дослідження взаємодії хондроцитів та збагаченої тромбоцитами плазми.

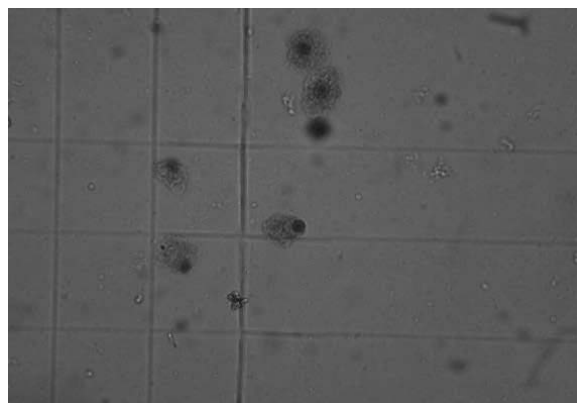
Суспензію клітин ПЯ, отриману із хвостового відділу хребта щурів шляхом механічного суспендування в поживному середовищі, розділяли на дві порції: контрольну (без додавання ЗТП) та експериментальну (суспензія хондроцитоподібних клітин + збагачена тромбоцитами плазма різної концентрації).

Суспензія клітин пульпозного ядра, отримана із хвостового відділу хребта щурів, складалася з поодиноких клітин та агрегатів по (4-15) клітин, кількість живих клітин в якій складала (66 ± 5) %. Живі клітини характеризувались округлою бластоподібною формою. Загиблі клітини мали здебільше полігональну форму, пікнотичну цитоплазму та децентралізоване положення ядра. Після 3 діб культивування в контрольних зразках культур клітин

пульпозного ядра чисельність живих клітин не перебільшувала (28 ± 2) %. Загиблі клітини були переважно диференційованими хондроцитами.

Дослідження життєздатності клітин ПЯ щура при культивуванні з різними концентраціями ЗТП показало, що через 3 доби в культурах з ЗТП 3 %, 10 %, 20 % та 30 % кількість живих клітин становила (50 ± 3,5) %, (65 ± 4,7) %, (60 ± 4,2) % та (66 ± 5,3) % відповідно, що вище ніж у контрольних зразках у 1,8 ($P = 0,0004$); 2,3 ($P = 0,0001$); 2,1 ($P = 0,0002$) та 2,4 ($p = 0,0005$) рази, відповідно. Клітини в культурах з додаванням ЗТП мали закруглену форму, середній розмір цитоплазми та велике світле ядро, тобто за морфологією нагадували хондробласти (рис. 1).

Контроль



Культивування з ЗТП

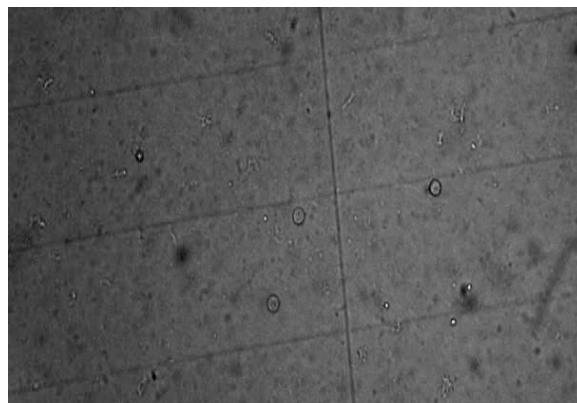


Рис. 1. Суспензія клітин ПЯ. 3 доба культивування. Забарвлення трипановим синім. 36. х 40.

З метою більш детального аналізу взаємодії хондроцитів пульпозного ядра з тромбоцитами ЗТП в умовах *in vitro* були проведені молекулярно-генетичні дослідження культуральної популяції експериментальних зразків у порівнянні з контрольними. Для вирішення цього завдання визначали експресію генів — маркерів хондрогенних

клітин та хрящового екстраклітинного матриксу: колагену II — *col II*, агрекану — *acan*, гліпікану — *gpc3*, анексину — *anx3*, плеотрофіну — *ptn*, матричного протеїну *gla* — *mgp* та віментину — *vim* клітинами пульпозного ядра *in vitro*. Вибір цих генів обумовлений структурно-функціональним значенням їх продуктів для міжхребцевого диска, а також існуючими даними про знижений рівень експресії цих білків клітинами дегенеруючого пульпозного ядра [6, 14]. Основний склад ПЯ — це вода та колагенові волокна, занурені в матрикс із протеогліканового гелю, та клітини матриксу, що здійснюють синтез компонентів диску. Основний протеоглікан ПЯ — агрекан. Також до важливих протеогліканів структур міжхребцевих дисків відносять гліпікан 3, що регулює дію різних факторів росту. В організації екстраклітинного матриксу кісткової тканини та хряща беруть участь також анексин А3, матриксний *gla* протеїн (*mgp*), віментин, плеотрофін.

Експресію генів визначали в зразках культури клітин пульпозного ядра через 3 доби культивування (контрольна група) та в зразках культури клітин через 3 доби культивування з додаванням ЗТП різної концентрації (експериментальні групи).

Як свідчать отримані результати (рис. 2, 3), експресія генів хондрогенних маркерів на 3 добу культивування в суспензії клітин ПЯ щура без додавання ЗТП знижувалась порівняно з експресією відповідних генів клітинами ПЯ без культивування, а експресія гена *mgp* не визначалася взагалі.

При додаванні збагаченої тромбоцитами плазми у концентрації 3, 10, 20 та 30 % по відношенню до суспензії клітин пульпозного ядра рівень експресії всіх зазначених генів у більшості випадків зростав порівняно зі зразками без ЗТП. При цьому динаміка відновлення експресії генів хондрогенних маркерів та маркерів позаклітинного хрящового матриксу мала дозозалежний характер (див. рис. 2, 3).

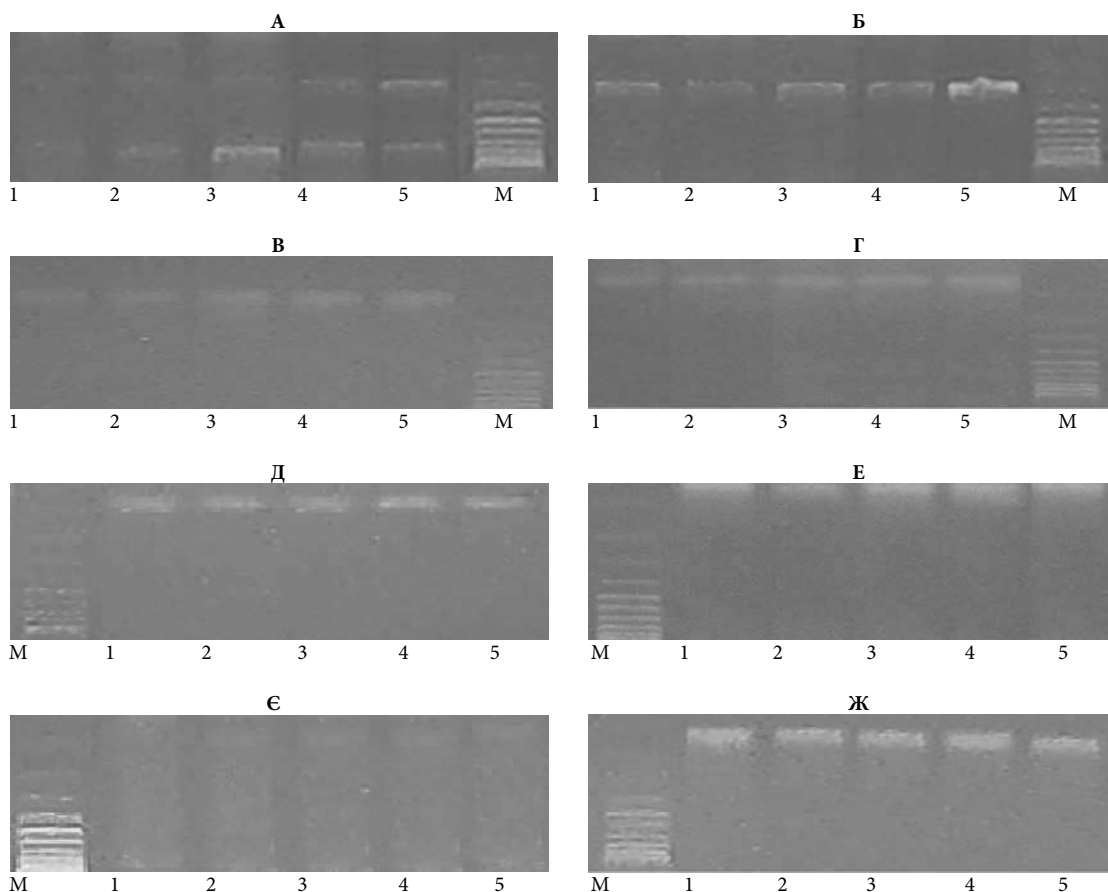


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації генів: А — *col II* (275 п.н.), Б — *acan* (284 п.н.), В — *vim* (80 п.н.), Г — *anxa* (94 п.н.), Д — *gpc* (86 п.н.), Е — *ptn* (72 п.н.), Є — *mgp* (69 п.н.), Ж — *GAPDH* (119 п.н.) в культурі клітин пульпозного ядра щурів: 1 — контрольна група (без ЗТП), 2 — експериментальна група (ЗТП 3 %), 3 — експериментальна група (ЗТП 10 %), 4 — експериментальна група (ЗТП 20 %), 5 — експериментальна група (ЗТП 30 %); М — ДНК-маркер довжиною 100 п.н. — 1000 п.н.

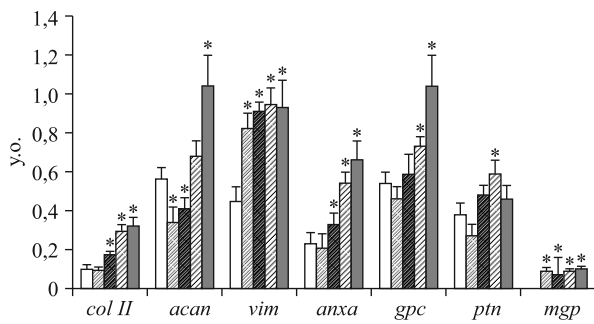


Рис. 3. Рівень експресії генів (у.о.) у суспензії клітин ПЯ через 3 доби культивування без додавання ЗТП (контрольна група) та з додаванням ЗТП різної концентрації:

- — суспензія клітин ПЯ без додавання ЗТП (контрольна група),
- ▨ — суспензія клітин ПЯ + ЗТП у концентрації 3 %,
- ▩ — суспензія клітин ПЯ + ЗТП у концентрації 10 %,
- ▧ — суспензія клітин ПЯ + ЗТП у концентрації 20 %,
- — суспензія клітин ПЯ + ЗТП у концентрації 30 %.

* — $P < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Так, при додаванні ЗТП у концентрації 3 % до культурального середовища на 3 добу культивування для генів *col II*, *anxa*, *gpc* та *ptn* визначалися ті ж рівні експресії, що і в контрольних зразках. Рівень експресії гена *vim* перевищував цей показник в контрольній групі в 1,8 раза. Для гена *mgr* спостерігалось відновлення детектування його експресії. Лише рівень експресії гена агрекану був у 1,6 раза нижчий за контрольний показник ($P < 0,05$).

Для експериментальних зразків клітин пульпозного ядра, до яких ЗТП додавали у концентрації 10 %, було виявлено більш істотне порівняно з попередньою групою зростання рівня експресії ряду досліджуваних генів, а саме: гена *col II* — у 1,7, *vim* — у 1,8, *anxa* — у 1,4 рази ($P < 0,05$); експресія гена *mgr* визначалася на попередньому рівні; рівень експресії гена *acan* був зниженим порівняно з контролем у 1,4 рази ($P < 0,05$).

При додаванні збагаченої тромбоцитами плазми у концентрації 20 % експресія більшості досліджуваних генів перевищувала відповідний показник у зразках без додавання ЗТП: *col II* — у 2,9 рази, *vim* — у 2,1 рази, *anxa* — у 2,3 рази, *gpc* — у 1,4 рази, *ptn* — у 1,6 рази ($P < 0,05$). Крім того, в даній групі спостерігалася тенденція до зростання експресії гена *acan* порівняно з контролем.

Дослідження впливу ЗТП максимальної концентрації (30 %) збагаченої тромбоцитами плазми на експресію досліджуваних генів виявило подальший вплив на рівень експресії двох генів протеогліканів — *acan* та *gpc* (в 1,9 рази порівняно з контрольною групою) та гена *anxa* — у 2,8 рази

($P < 0,05$). Решта показників не відрізнялася від попередньої групи.

Виявлене зростання рівня експресії досліджуваних генів при культивуванні клітин пульпозного ядра в присутності ЗТП свідчить про активуючий вплив останньої на метаболічну активність хондроцитоподібних клітин, яка забезпечує сталість їх екстраклітинного оточення та, як наслідок, підтримання біомеханічних властивостей пульпозного ядра.

Отримані результати узгоджуються з тими нечисленними даними щодо застосування аутологічної ЗТП при дегенеративно-дистрофічних та травматичних ураженнях хребта, що представлені в літературі. Так, автори роботи [2] на експериментальній моделі дорсопатії хребта у щурів апробували метод корекції ураження збагаченою тромбоцитами плазмою і зробили висновок, що ЗТП позитивно впливає на регенеративні процеси в тканинах міжхребцевих дисків, про що свідчило зменшення кількості вогнищ фібронекрозу, ступеня розшарування колагенових волокон; при цьому спостерігалось збільшення висоти фіброзного кільця та епіфізів тіл хребців. Застосування ЗТП у комбінації зі стовбуровими клітинами мало позитивний вплив на щурів з травмою хребта у відношенні функціонального відновлення шляхом прискорення ремієлінізації аксонів [20].

Таким чином, культивування клітин пульпозного ядра зі збагаченою тромбоцитами плазмою різних концентрацій показало, що використання ЗТП дозозалежно сприяє виживанню значно більшої чисельності клітин пульпозного ядра, а також експресії генів хондрогенних маркерів та матричних білків.

Висновки

1. Встановлено, що внесення збагаченої тромбоцитами плазми в культуру клітин пульпозного ядра сприяє збереженню кількості життєздатних клітин відповідно їх рівню в нативних зразках.
2. Додавання 3 %, 10 %, 20 % та 30 % ЗТП дозозалежно підвищує життєздатність клітин пульпозного ядра. Більш ефективними для підтримки життєздатності клітин ПЯ були препарати з концентрацією тромбоцитів 10 %, 20 %, 30 % ЗТП порівняно з 3 %.
3. Показано, що в культурі суспензії клітин пульпозного ядра, до якої додавали ЗТП, спостерігається активація експресії генів хондрогенних маркерів, а саме, зростання рівня експресії генів колагену, анексіну, агрекану, віментину, гліпікану, плеотрофіну, а також виявляється експресія гена матричного протеїну *gla*, який

не детектується у зразках без збагаченої тромбоцитами плазми.

4. Додавання збагаченої тромбоцитами плазми дозозалежно запобігає зниженню експресії до-

сліджуваних хондрогенних маркерних генів у порівнянні зі зразками без ЗТП. Найбільш ефективними для підтримки експресії генів виявилися препарати ЗТП 20 % та 30 %.

Список використаної літератури

1. Ачкасов Е. Е., Безуглов Э. Н., Ульянов А. А., Куршев В. В. Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в клинической практике // Биомедицина. — 2013. — № 4. — С. 46-59.
2. Холодкова Е. Л., Цюрупа А. В., Садовская Ю. А., Горюк И. А. Морфологические проявления дегенеративно-дистрофических поражений позвоночника в эксперименте и после коррекции // Молодой ученый. — 2016. — № 7. — С. 291-295.
3. Antoniou J., Steffen T., Nelson F., Winterbottom N. H. et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration // J. Clin. Invest. — 1996. — 98, № 4. — P. 996-1003.
4. Bissell L., Tibrewal S., Sahni V., Khan W. S. Growth factors and platelet rich plasma in anterior cruciate ligament reconstruction // Curr. Stem Cell Res. Ther. — 2014. — 10, № 1. — P. 19-25.
5. Bertrand R. L., Senadheera S., Tanoto A. et al. Serotonin availability in rat colon is reduced during a Western diet model of obesity // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2012. — 303, № 3. — P. 424-434.
6. Chen S., Hu Z. J., Zhou Z. J. et al. Novel molecular markers for degenerated nucleus pulposus in a chinese population // Spine. — 2015. — 40, № 16. — P. 1252-1260.
7. Drengk A., Zapf A., Sturmer E. et al. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells // Cells Tissues Organs. — 2009. — 189, № 5. — P. 317-326.
8. Elder S., Thomason J. Effect of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation in three-dimensional culture // Open Orthop. J. — 2014. — 8. — P. 78-84.
9. Fu W., Li Q., Li J. Application of platelet-rich plasma in clinical orthopedics // Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. — 2014. — 28, № 10. — P. 1311-1316.
10. Hanada K., Solchaga L., Caplan A. et al. BMP-2 induction and TGF- β 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis // J. Cell. Biochem. — 2001. — 81. — P. 284-294.
11. Hidaka C., Khan S., Farmer J., Sandhu H. S. Gene therapy for spinal applications // Orthop. Clin. North. Am. — 2002. — 33. — P. 439-446.
12. Jeong D. U., Lee C. R., Lee J. H. et al. Clinical applications of platelet-rich plasma in patellar tendinopathy // Biomed. Res. Int. — 2014. — doi: 10.1155/2014/249498.
13. Lee C. R., Sakai D., Nakai T. et al. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat // Eur. Spine J. — 2007. — 6, № 12. — P. 2174-2185.
14. Massey C. J., van Donkelaar C. C., Vresilovic E. et al. Effects of aging and degeneration on the human intervertebral disc during the diurnal cycle: a finite element study // J. Orthop. Res. — 2012. — 30, № 1. — P. 122-128.
15. Peng L., Jia Z., Yin X. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue // Stem Cells Dev. — 2008. — 17, № 4. — P. 761-773.
16. Rodriguez A., Growney E. A., Kalaf E. A., Sell S. A. Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy // Biomed. Res. Int. — 2014. — doi: 10.1155/2014/392398.
17. Senzel L., Gnatenko D. V., Bahou W. F. The platelet proteome // Curr Opin Hematol. — 2009. — 5. — P. 329-333.
18. Smyth N. A., Murawski C. D., Fortier L. A. et al. Platelet-rich plasma in the pathologic processes of cartilage: review of basic science evidence // Arthroscopy. — 2013. — 29, № 8. — P. 1399-1409.
19. Wang J. V., Baer A. E., Kraus V. et al. Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture // Spine. — 2001. — 26. — P. 1747-1752.
20. Zhao T., Yan W., Xu K. et al. Combined treatment with platelet-rich plasma and brain-derived neurotrophic factor-overexpressing bone marrow stromal cells supports axonal remyelination in a rat spinal cord hemi-section model // Cytotherapy. — 2013. — 15, № 7. — P. 792-804.

Одержано 17.10.2018

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ НА ХОНДРОГЕНЕЗ КЛЕТОК ПУЛЬПОЗНОГО ЯДРА КРЫС *IN VITRO*

**Е. Г. Педаченко, М. В. Хижняк, І. Г. Васильєва, Н. Г. Чопик, Ю. Є. Педаченко,
Н. П. Олексенко, І. М. Шуба, Е. С. Галанта, О. І. Цюбко**

Государственное учреждение “Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова
НАМН Украины”, 04050 Киев

Целью данного исследования было изучение влияния обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) различной концентрации на хондрогенные свойства клеток пульпозного ядра крыс на основе оценки их жизнеспособности и экспрессии генов хондрогенных маркеров.

Культивирование проводили в течение 3 суток; контрольные образцы культивировали без добавления ОТП; в экспериментальные культуры добавляли ОТП из расчета, чтобы тромбоциты составляли 3 %, 10 %, 20 % и 30 % от концентрации клеток пульпозного ядра в культуральном образце. Установлено, что внесение обогащенной тромбоцитами плазмы в культуру клеток пульпозного ядра дозозависимо способствует сохранению жизнеспособности клеток и экспрессии генов хондрогенных маркеров (коллагена, аннексина, агрекана, виментина, глипикана, плеотрофина, матриксного протеина *gla*). Наиболее эффективными оказались препараты ЗТП 20 % и 30 %. Полученные данные указывают на перспективность применения обогащенной тромбоцитами плазмы при лечении патологий позвоночника, в частности, его дегенеративных и травматических поражений.

EFFECT OF VARIOUS CONCENTRATION OF PLATELETS IN BLOOD PLASMA ON CHONDROGENESIS OF THE RAT NUCLEUS PULPOSUS CELLS *IN VITRO*

**E. G. Pedachenko, M. V. Khizhniak, I. G. Vasilyeva, N. G. Chopyck, Yu. E. Pedachenko,
N. P. Oleksenko, I. M. Shuba, O. S. Galanta, O. I. Tsiubko**

State institution “Acad. A. P. Romodanov Institute of Neurosurgery NAMS Ukraine”, 04050 Kyiv

The purpose was to study the effect of platelet rich plasma (PRP) of different concentrations on the chondrogenic properties of the rat nucleus pulposus cells based on an assessment of their viability and on the expression of chondrogenic markers. Cultivation was carried out for 3 days; control samples were cultured without the addition of PRP; in experimental cultures, PRP was added at a concentration of 3 %, 10 %, 20 % and 30 % of the cells of the pulpal nucleus in the culture sample.

It has been established that the introduction of platelet rich plasma into the cell culture of the nucleus pulposus contributes in a dose-dependent manner to preserving cell viability and gene expression of chondrogenic markers (collagen, annexin, aggrecan, vimentin, glypican, pleotrophin, matrix protein *gla*). The most effective proved to be PRP 20 % and 30 %. The data obtained indicate the promising use of platelet rich plasma in the treatment of spinal pathologies, in particular, its degenerative and traumatic lesions.