

Розділ 11

Окремі питання сучасної медицини

© Проблеми військової охорони здоров'я, 2012
УДК 575.117: 616.721.1: 57.08

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ AGGREGAN-1 ТА COL II ПРИ АУТОТРАНСПЛАНТАЦІЇ ХОНДРОБЛАСТІВ У МІЖХРЕБЦЕВІ ДИСКИ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ ОСТЕОХОНДРОЗУ

І.Г.Васильєва, Ю.Г.Гафійчук, І.М.Шуба

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова
НАМН України», Міністерство оборони України,
Військово-медичний клінічний центр Південного регіону
Київ, Одеса, Україна

Вступ

Дегенеративні захворювання хребта залишаються актуальною проблемою і на даний момент не тільки з медичної сторони, а також із соціальної, у зв'язку з тим, що остеохондрозом хребта хворіють більше 80 відсотків населення, із них 50% звертаються за медичною допомогою до лікаря, а 22% потребують оперативного лікування. Значимість даної проблеми підкреслює створення Європейської науково-практичної програми «EuroDisk», що об'єднує в собі декілька наукових центрів ЕС. Існуючі методи лікування переважно спрямовані на усунення нейрокомпресійних синдромів, а не на стимуляцію власного регенераторного потенціалу міжхребцевого диска. Розробка нових підходів із застосуванням біотехнологій спрямована на відновлення репаративного хондрогенезу: зменшення клінічної симптоматики, відновлення гідрофільності диска, збереження біомеханіки хребта. Сучасні методи регенерації міжхребцевого диска (МД) включають: фактори росту, генну терапію, клітинну терапію, терапію з використанням мезенхімальних стовбурових клітин та використання аутологічних клітин. Як відомо, клітинна тех-

нологія дозволяє не міняти пошкоджений орган, а «обновлювати» його клітинний склад, тому, з нашої точки зору, використання методу аутотрансплантації клітин є перспективним для подальших досліджень та широкого клінічного впровадження.

Механічні властивості і функції МД забезпечуються міжклітинною матрицею, основним компонентом якої є колаген та агрекан (протеоглікан). Колагенова сітка утворена колагеновими волокнами I та II типу, які забезпечують його міцність та еластичність, а також фіксують МД до тіл хребців. Агрекан, який складається з хондроїтину та кератинсульфату, є основним протеогліканом диска та забезпечує його гідратацію. Основним елементом дегенерації МД є зменшення кількості протеогліканів. Відбувається фрагментація агреканів, втрата глікозаміногліканів, що, в свою чергу, призводить до зниження осмотичного тиску, і, як в наслідок, виникає дегідратація диска.

Мета дослідження — оцінити зміни експресії генів *Aggrecan-1* та *COL II* в міжхребцевих дисках в умовах асиметричної статичної компресії-дистензії (АСКД) та після аутотрансплантації хондробластів.

Матеріали та методи дослідження

Модель, основу на асиметричній статичній компресії міжхребцевих дисків у хвостовому відділі хребта, створювали на лабораторних тваринах — щурах-самцях лінії Wistar віком 4-5 місяців вагою 200-220 г методом резекції дистальної частини хвоста з подальшою фіксацією хвоста в зігнутому положенні. Протокол експериментів затверджено Комісією з біоетики ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України» відповідно до правил Європейської конвенції захисту хребетних тварин [1]. Тварини в експерименті перебували від 1 до 4 місяців і були розподілені на відповідні групи (табл. 1). Через відповідний термін проводилась релаксація хвостового відділу хребта тваринам контрольної групи методом хірургічного відокремлення дистального відділу хвоста від м'яких тканин поперекового відділу хребта в місці попередньої фіксації.

З тканини пульпозного ядра дисків резецированної частини хвоста тварин виділяли хондробласти. Культивування проводили в середовищі Ігла в стандартних умовах [2]. Кожні 3-4 доби проводили зміну поживного середовища S об'єму. На 20-30 день культивування в культурі спостерігали щільний шар клітин висотою 3-5 клітинних тілець, в якому зберігались міжклітинні контакти (рис. 1).

Після відповідного терміну дослідним тваринам пункційним методом проводили аутотрансплантацію хондробластів у ділянку дегенерованих дисків у кількості 5×10^6 клітин/мл до повного заповнення дефекту (рис. 2). Чисельність живих клітин підраховували в камері Горяєва на початку (через добу після посадки) та по закінченні терміну культивування. Кількість клітин для трансплантації становила 5×10^6 кл/мл в об'ємі приблизно 10-12 мкл, живі клітини в суспензії становили 93-95%.

Через 30 та 60 діб відповідно після аутотрансплантації за допомогою методу ПЛР досліджували рівень транскриптів мРНК Aggrecan-1 та COL II в тканині дисків контрольних та дослідних тварин.

Виділення РНК проводили стандартним методом з використанням набору «Рибо-сорб» («Amplisens», Росія) відповідно до протоколу.

Вихід та чистоту препарату РНК оцінювали за поглинанням проби при 260 та 280 нм.

Реакцію зворотної транскрипції проводили з використанням набору «RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit» («Fermentas», Литва) відповідно до протоколу. В якості контрольного гена було використано ген гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогенази (GAPDH) за інструкцією до набору.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з використанням ампліфікатора «Терцик» (ДНК технологія, Росія) та набору для проведення класичної ПЛР «PCR-core» («GENPAQ», Росія). Експресію гена COL II досліджували з використанням наступної пари праймерів («Fermentas», Германия): (for) 5'-caccgctaacgtccagatgac-3', (rev) 5'-ggaaggcgtgaggtcttctgt-3' (продукт ампліфікації 275 п.н.) за програмою 60°C-2 хв. (1 цикл); 95°C-1 хв., 53°C-40 сек., 74°C-1 хв. (42 цикла), 74°C-1 хв. [3].

Експресію гена, що кодує Aggrecan-1, досліджували з використанням наступної пари праймерів: (for) 5'-ccactggagaggactgcgtag-3', (rev) 5'-ggctctgtgcaagtgattcgag-3' (продукт ампліфікації 244 п.н.) за програмою 60°C-2 хв. (1 цикл); 95°C -1 хв., 53°C-40 сек., 74°C-1 хв. (42 цикла), 74°C-1 хв. [3].

Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили в 2% агарозному гелі з використанням трис-ацетатного буфера (рис. 3, 4).

Результати дослідження та їх обговорення

Результати попередніх робіт зі створення відповідної моделі ос-

теохондрозу показали, що модель АСКД хвостового відділу хребта щурів достатньо повно відображає дегенеративні зміни МД, характерні для ознак остеохондрозу, що підтверджено даними морфологічних досліджень [4, 5].

Дослідження експресії гена Aggrecan-1 показало, що у тварин, які перебували в стані компресії 30 діб ($n=3$), змін експресії не спостерігалось порівняно з інтактною групою тварин ($n=4$), у той час як у тварин, які перебували в стані компресії 60 діб ($n=3$), спостерігали незначне зменшення рівня транскриптів. У групі тварин, яким проводили релаксацію (контрольна група) після 30 діб АСКД спостерігали відновлення рівня транскриптів як агрекану, так і колагену майже до рівня групи інтактних тварин. У групі тварин після 60 діб АСКД відновлення після релаксації спостерігалось лише у 2 з 5 тварин і тільки відносно транскриптів агрекану. Відносно експресії гена COL II в досліджуваних групах рівень транскриптів відповідав групі АСКД, за виключенням одного випадку.

Через два місяці після трансплантації аутохондробластів зафіксовано незначне збільшення рівня експресії гена агрекану порівняно з контрольною групою. У той же час цей рівень майже в 1,5 разу був вищим порівняно з інтактною групою тварин ($p<0,05$, критерій t-Стюдента).

Рівень експресії гена COL II у тканині дисків у групі тварин з компресією 30 діб майже не відрізнявся від рівня експресії відносно інтактної групи. У групі тварин, які перебували 60 діб у стані АСКД, рівень експресії COL II був в 1,3 разу нижчим порівняно з контрольною групою. Після трансплантації аутохондробластів у групі тварин з компресією 1 та 2 місяці рівень транскриптів COL II був майже в 1,5 разу більшим порівняно з контрольною групою тварин, але в той же час він був меншим порівняно з інтактною групою тварин.

Таким чином, дослідження показало, що асиметрична компресія міжхребцевих дисків призвела до зниження рівня транскриптів агрекану та колагену, а також зниження коефіцієнта співвідношення між ними, а при трансплантації аутохондробластів спостерігалась тенденція до відновлення кількості транскриптів мРНК агрекану та колагену.

Висновок

На відтвореній моделі статичної асиметричної компресії протягом 60 діб відмічається дегенерація міжхребцевого диска, що підтвер-

джується зниженню рівня транскриптів агрекану-І та колагену-ІІ в зоні компресії, а проведена трансплантація аутохондробластів зупиняє розвиток дегенеративних змін у міжхребцевих дисках та сприяє регенерації, що підтверджується відновленням кількості транскриптів мРНК агрекану-І та колагену-ІІ.

Література

1. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 р.: офіційний переклад / Верховна Рада України. — Офіц. веб-сайт. (Міжнародний документ Ради Європи). — Режим доступу до документа: електронний ресурс: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?reg=994_137].
2. Культура животних кліток. Методи / Под. ред. Р.Фрешни. — М.: Мир, 1989. — 302 с.
3. Peng L., Jia Z., Yin X., Zhang X. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue // Stem. Cells. Dev. — 2008. — Vol.17, №4. — P. 761-773.
4. Григоровский В.В., Хижняк М.В., Васильева И.Г., Шуба И.Н., Гафийчук Ю.Г. Патоморфологические изменения межпозвоночных дисков и тел позвонков хвоста крыс при асимметричной статичной компрессионно-дистензии в эксперименте. Мат. конф. «Сучасні дослідження в ортопедії та травматології». Харків, 6-7 жовтня 2011р. — С. 73-74.
5. Vasilyeva I., Shuba I., Khyzhnyak M., Chopik N., Oleksenko N., Gafiychuk Yu. Auttransplantation of chondroblasts into intervertebral discs condition of asymmetrical compression in experiment. Materials of the EANS Congress. Rome, 9-14 October, 2011.

Таблиця 1

Групи експериментальних тварин

1. Інтактна група тварин (4 тварини, 12 МД);
2. АСКД 1 місяць (3 тварини, 9 МД);
3. АСКД 1 місяць + релаксація (3 тварини, 9 МД);
4. АСКД 1 місяць + трансплантація аутохондробластів (3 тварини, 9 МД);
5. АСКД 2 місяці (3 тварини, 9 МД);
6. АСКД 2 місяці + релаксація (4 тварини, 12 МД);
7. АСКД 2 місяці + трансплантація аутохондробластів 30 діб (3 тварини, 9 МД);
8. АСКД 2 місяці + трансплантація аутохондробластів 60 діб (5 тварин, 13 МД);

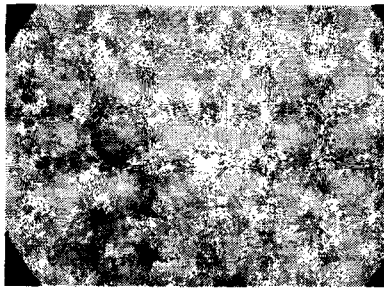


Рис. 1. Зріз, що формує зони росту. Незабарвлена жива культура. Інкубація в стандартних умовах протягом 30 діб. (Інвертований мікроскоп П-3 виробництва С.-Петербург, збільшення $\times 150$.)

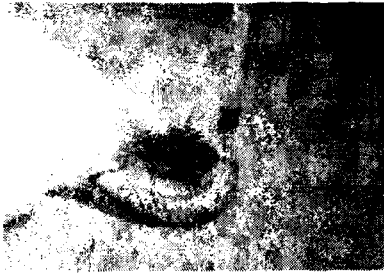
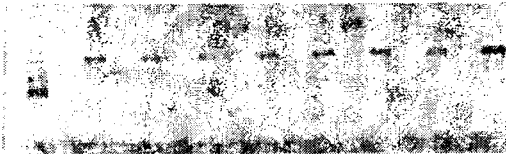


Рис. 2. Пункційне введення аутологічних хондробластів у дегенеративні міжхребцеві диски.

Визначення рівня експресії гена Aggrecan-1.



М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК/РНК генів агрекану (Aggrecan-1) — 284 п.н.:

М — маркер молекулярної маси ДНК (100-500 п.н.).

1, 2 — інтактна тварина;

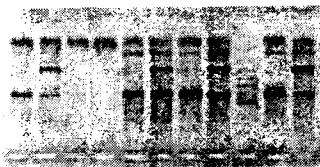
3-6 — 60 діб компресії;

7-8 — релаксація;

9-12 — 60 діб компресії + трансплантація 30 діб;

- 13-14 — 60 діб компресії + трансплантація 60 діб;
 15 — негативний контроль;
 16 — позитивний контроль.

Визначення рівня експресії гену COL II.



1 2 3 4 5 6 7 8 М 9 10

Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК/РНК генів колагену (COL II) — 275 п.н.:

- 1-2 — інтактні тварини;
 3-4 — 1 місяць компресії;
 5-6 — 1 місяць компресії + трансплантація;
 7-8 — 1 місяць компресії + трансплантація;
 9-10 — 1 місяць компресії + релаксація;
 М — маркер молекулярної маси ДНК (100-500 п.н.).