

Оригінальна стаття = Original article = Оригінальная статья

Ukr Neurosurg J. 2020;26(4):26-34

doi: 10.25305/unj.209837

Вплив збагаченого тромбоцитами фібринового матриксу в комплексі зі штучним матеріалом Nubiplant на експресію хондрогенних маркерних генів та морфогенез клітин пульпозного ядра міжхребцевих дисків щурів*Педаченко Є.Г.¹, Васильєва І.Г.², Хижняк М.В.¹, Чопик Н.Г.², Олексенко Н.П.², Шуба І.М.², Цюбко О.І.², Галанта О.С.², Дмитренко А.Б.², Макарова Т.А.²*

¹ Відділення малоінвазивної і лазерної спінальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

² Відділ нейробіохімії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

Надійшла до редакції 12.08.2020
Прийнята до публікації 02.10.2020

Адреса для листування:

Чопик Наталія Григорівна, Відділ нейробіохімії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, 04050, Україна, e-mail: natalia.chopyck@gmail.com

Мета: дослідити бар'єрні та біологічні властивості збагаченого тромбоцитами фібринового матриксу (ЗТФМ), штучного біополімеру Nubiplant та їх суміші шляхом оцінки життєздатності та морфологічних характеристик клітин пульпозного ядра (ПЯ) міжхребцевих дисків щурів, а також рівня експресії хондрогенних маркерних генів при культивуванні цих клітин за наявності зазначених матриксів.

Матеріали і методи. ЗТФМ отримували зі збагаченої тромбоцитами плазми з використанням активатора згортання SiO₂, суспензію клітин ПЯ – із хвостового відділу хребта щурів. Культивування здійснювали за наявності одного з трьох матриксів – ЗТФМ, Nubiplant або їх суміші протягом 3, 7 та 14 діб за стандартних культуральних умов в інкубаторі EC-160 (Nüve, Турція). Спостереження за живою культурою проводили в пограничній з матриксами зоні в межах одного поля зору з використанням інвертованого мікроскопа (Nicon TS100, Японія). Експресію хондрогенних маркерних генів у культурі клітин ПЯ визначали методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією.

Результати. Дослідження життєздатності та морфологічних характеристик клітин ПЯ при їх культивуванні продемонструвало зниження вмісту живих клітин у контрольних зразках. У культурах із ЗТФМ та сумішшю ЗТФМ і Nubiplant кількість живих клітин статистично значущо перевищувала контрольні показники. Спостерігали агрегацію клітин у зоні безпосереднього межування з матриксами з боку нанесення. Виселення клітин на протилежний бік матриксу протягом 14 діб у жодному з експериментальних зразків не відзначено. Таким чином, ЗТФМ, Nubiplant та їх суміш можуть виконувати бар'єрні функції щодо утримання клітинної популяції в певній ділянці. Експресія генів COL II, ACAN, GPC3, ANXA3, PTN, MGP та VIM клітинами ПЯ при культивуванні протягом 3 та 7 діб за наявності ЗТФМ і суміші ЗТФМ та Nubiplant зростала порівняно з контрольними зразками.

Висновки. Застосування ЗТФМ, Nubiplant або суміші ЗТФМ і Nubiplant при культивуванні клітин ПЯ продемонструвало відсутність виселення клітин на протилежний бік зазначених матриксів протягом усього періоду дослідження (14 діб). Використання ЗТФМ, Nubiplant або суміші ЗТФМ і Nubiplant сприяло формуванню колоній клітин хондроцитоподібної морфології у зоні межування з матриксами та підтримувало життєздатність клітин протягом усього досліджуваного періоду. Застосування ЗТФМ і суміші ЗТФМ та Nubiplant давало змогу підтримувати експресію хондрогенних генів клітинами ПЯ в пограничній з матриксами зоні. Отримані результати свідчать про позитивну дію матриксів на основі збагаченого тромбоцитами фібрину на клітини ПЯ та його бар'єрні функції, що є перспективним для застосування ЗТФМ з метою запобігання формуванню рубцево-спайкових процесів.

Ключові слова: пульпозне ядро; збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс; експресія генів



Effect of platelet-rich fibrin matrix in complex with artificial material Nubiplant on expression of chondrogenic marker genes and morphogenesis of the nucleus pulposus cells of intervertebral discs in rats

Eugene G. Pedachenko¹, Iryna G. Vasylieva², Mykhaylo V. Khyzhnyak¹, Natalia G. Chopyk², Natalia P. Oleksenko², Iryna M. Shuba², Olga I. Tsjubko², Olena S. Galanta², Anzhela B. Dmytrenko², Tetiana A. Makarova²

¹ Department of Miniinvasive and Laser Spinal Neurosurgery, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine

² Neurobiochemistry Department, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine

Received: 12 August 2020

Accepted: 02 October 2020

Address for correspondence:

Natalia G. Chopyk,
Neurobiochemistry Department,
Romodanov Neurosurgery Institute,
32 Platona Mayborody st., Kyiv,
04050, Ukraine, e-mail: natalia.chopyck@gmail.com

The purpose was to study the barrier and biological properties of platelet-rich fibrin matrix (PRFM), an artificial biopolymer Nubiplant, and a mixture of PRFM / Nubiplant by assessing the viability and morphological characteristics of nucleus pulposus (NP) cells in rats, as well as the expression level of chondrogenic marker genes during cell cultivation in the presence of these matrices.

Materials and methods. PRFM was obtained from platelet-rich plasma using a SiO₂ coagulation activator. A suspension of nucleus pulposus cells was obtained from the caudal spine of rats. Cultivation was carried out in the presence of one of three matrices — PRFM, Nubiplant, or their mixture for 3, 7, and 14 days under standard culture conditions in an EC-160 incubator (Nüve, Turkey). Observation of the living culture was carried out in the area bordering with the matrix within one field of view using an inverted microscope (Nikon TS100, Japan). The expression of chondrogenic marker genes in the cell culture of the NP was determined by the method of PCR with reverse transcription.

Results. The study of the viability and morphological characteristics of NP cells during their cultivation for 3, 7, and 14 days in the presence of PRFM, PRFM / Nubiplant, or Nubiplant showed a decrease in the content of living cells in control samples; in cultures with PRFM and PRFM / Nubiplant, the number of living cells significantly exceeded the control values, aggregation of cells was observed in the area bordering with the matrices from the side of the application. None of the experimental samples showed the outflow of cells to the opposite side of the matrix after 14 days of cultivation; thus, PRFM, Nubiplant, and their mixture can perform barrier functions to keep the cell population in a certain location. Expression of the COL II, ACAN, GPC3, ANXA3, PTN, MGP, and VIM genes by the NP cells during cultivation for 3 and 7 days in the presence of PRFM and PRFM / Nubiplant increased as compared to the control samples.

Conclusions. The use of PRFM, Nubiplant, or a mixture of PRFM / Nubiplant during the cultivation of NP cells demonstrated the absence of cell outflow to the opposite side of the studied matrices during the study period (14 days). The use of PRFM, Nubiplant, or a mixture of PRFM / Nubiplant promoted the formation of cell colonies with chondrocyte-like morphology in the zone bordering with the matrices and maintained cell viability throughout the study period. PRFM and PRFM / Nubiplant contributed to the maintenance of the expression of chondrogenic genes in the NP cells in the zone bordering the matrices. The results obtained indicate the positive effect of the matrix based on platelet-rich fibrin on the NP cells and its barrier functions, which is promising for the use of PRFM for preventing the formation of cicatricial adhesion.

Keywords: nucleus pulposus; platelet-rich fibrin matrix; gene expression

Влияние обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса в комплексе с искусственным материалом Nubiplant на экспрессию хондрогенных маркерных генов и морфогенез клеток пульпозного ядра межпозвоночных дисков крыс

Педаченко Е.Г.¹, Васильева И.Г.², Хижняк М.В.¹, Чопик Н.Г.², Олексенко Н.П.², Шуба И.Н.², Цюбко О.И.², Галанта Е.С.², Дмитренко А.Б.², Макарова Т.А.²

¹ Отделение малоинвазивной и лазерной спинальной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

² Отдел нейробиохимии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

Поступила в редакцию 12.08.2020
Принята к публикации 02.10.2020

Адрес для переписки:

Чопик Наталия Григорьевна,
Отдел нейробиохимии, Институт
нейрохирургии им. акад.
А.П. Ромоданова, ул. Платона
Майбороды, 32, Киев, 04050,
Украина, e-mail: natalia.chopyck@gmail.com

Цель: исследовать барьерные и биологические свойства обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса (ОТФМ), искусственного биополимера Nubiplant и смеси ОТФМ и Nubiplant путем оценки жизнеспособности и морфологических характеристик клеток пульпозного ядра (ПЯ) межпозвоночных дисков крыс, а также уровня экспрессии хондрогенных маркерных генов при культивировании этих клеток при наличии указанных матриксос.

Материалы и методы. ОТФМ получали из обогащенной тромбоцитами плазмы с использованием активатора свертывания SiO₂, суспензию клеток ПЯ – из хвостового отдела позвоночника крыс. Культивирование осуществляли при наличии одного из трех матриксос – ОТФМ, Nubiplant или их смеси в течение 3, 7 и 14 суток при стандартных культуральных условиях в инкубаторе EC-160 (Nüve, Турция). Наблюдение за живой культурой проводили в пограничной с матриксом зоне в пределах одного поля зрения с использованием инвертированного микроскопа (Nikon TS100, Япония). Экспрессию хондрогенных маркерных генов в культуре клеток ПЯ определяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Исследование жизнеспособности и морфологических характеристик клеток ПЯ при их культивировании продемонстрировало снижение содержания живых клеток в контрольных образцах. В культурах с ОТФМ и смесью ОТФМ и Nubiplant количество живых клеток статистически значимо превышало контрольные показатели. Наблюдала агрегацию клеток в пограничной с матриксами зоне со стороны нанесения. Выселения клеток на противоположную сторону матрикса в течение 14 суток ни в одном из экспериментальных образцов не отмечено. Таким образом, ОТФМ, Nubiplant и их смесь могут выполнять барьерные функции по удержанию клеточной популяции в определенном участке. Экспрессия генов *COL II*, *ACAN*, *GPC3*, *ANXA3*, *PTN*, *MGP* и *VIM* клетками ПЯ при культивировании в течение 3 и 7 суток при наличии ОТФМ и смеси ОТФМ и Nubiplant возрастала по сравнению с контрольными образцами.

Выводы. Применение ОТФМ, Nubiplant или смеси ОТФМ и Nubiplant при культивировании клеток ПЯ продемонстрировало отсутствие выселения клеток на противоположную сторону упомянутых матриксов в течение всего периода исследования (14 дней). Использование ОТФМ, Nubiplant или смеси ОТФМ и Nubiplant способствовало формированию колоний клеток хондроцитоподобной морфологии в пограничной с матриксами зоне и поддерживало жизнеспособность клеток в течение всего исследуемого периода. Применение ОТФМ и ОТФМ и Nubiplant позволяло поддерживать экспрессию хондрогенных генов клетками ПЯ в пограничной с матриксами зоне. Полученные результаты свидетельствуют о положительном действии матрикса на основе обогащенного тромбоцитами фибрина на клетки ПЯ и его барьерные функции, что является перспективным для применения ОТФМ с целью предотвращения формирования рубцово-спаечных процессов.

Ключевые слова: пульпозное ядро; обогащенный тромбоцитами фибриновый матрикс; экспрессия генов

Вступ

Важливою проблемою сучасної вертебології є лікування дегенеративних захворювань, зокрема гриж міжхребцевих дисків (МХД) з нейрокомпресійним синдромом [1]. Більшість хворих з цією патологією потребують хірургічного лікування з використанням методики стандартної мікродискетомії, яке може супроводжуватися рецидивами, пов'язаними з формуванням рубцево-спайкового процесу в зоні операції [2]. Це зумовило необхідність вирішення нової складної міждисциплінарної проблеми – "синдрому прооперованого хребта" (failed back surgery syndrome) [3]. Розвиток синдрому спричинений структурними та біомеханічними змінами в тканинах хребтового стовпа, які виникають після операції. Однією з найбільш частих та складних змін є післяопераційний епідуральний фіброз [4].

Розвиток епідурального фіброзу зумовлений багатьма чинниками: порушенням бар'єра між спинним мозком, його оболонками та нервовими корінцями з оточуючими тканинами, дуральною компресією, локальним розладом крово- та лікворообігу і, як наслідок, – розвитком хронічного запалення та заміщення органоспецифічних компонентів фіброзною тканиною [5].

Нині не існує абсолютно ефективної методики запобігання розвитку епідурального фіброзу після операції на поперековому диску, незважаючи на велику кількість експериментальних та клінічних досліджень [6–8]. Запропоновано методи забезпечення бар'єра між оголеними твердою оболонкою та навколишніми тканинами, однак жодний з них не дає успішного та/або тривалого клінічного ефекту [9–12]. Таким чином, актуальним є пошук матеріалів і методів, які б одночасно з бар'єрною функцією сприяли регенеративним процесам та відновленню

структурно-функціональних властивостей уражених анатомічних структур МХД.

Триває вивчення можливостей використання біологічних методів репарації МХД, зокрема методів тканинної інженерії, інструментом якої є біодеградуювальні матрикси. Перспективним вважають збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс (ЗТФМ), а також ЗТФМ у поєднанні із синтетичними матриксами, що сприяє подовженню дії фібрину та позиціонуванню біоматеріалу в потрібному місці [13–15].

Матрикс на основі збагаченого тромбоцитами фібрину використовують для культивування клітин *in vitro*, а також для доставки *in vivo* стовбурових клітин [16,17]. Застосування ЗТФМ у регенеративній медицині та тканинній інженерії зумовлено його адгезивними властивостями, що сприяє залученню потенційних попередників хондроцитоподібних клітин, а також здатністю переносити матриксні білки та фактори росту [18]. Перевагами ЗТФМ є аутологічність, неімуногенність, відсутність хімічних та біохімічних перетворень [19].

Численні властивості ЗТФМ зумовлені наявністю в його складі депо біоактивних молекул (тромбоцитів). Участь тромбоцитів у процесах репарації опосередковується факторами росту, які містяться в α -гранулах. Основні з них: трансформувальний фактор росту β (TGF- β), фактор росту тромбоцитів (PDGF), інсуліноподібні фактори росту (IGF) I та II типу, фактор росту фібробластів (FGF), фактор росту епідермісу (EGF), фактор росту ендотелію судин (VEGF), а також адгезивні протеїни, фібринолітичні фактори, протеази тощо [20]. Таким чином, комплекс біоактивних молекул робить ЗТФМ не лише пасивним матеріалом, який забезпечує механічну підтримку клітин, а й індуктором їх життєздатності, проліферації, регулятором функціональної активності.

Для подовження активувальної дії ЗТФМ як один із методів запропоновано використання його суміші зі штучними матриксами на основі різних полімерів. Одним із таких матриксів є матеріал Nubiplant, який отримують при полімеризації акрилових мономерів.

Мета: дослідити бар'єрні та біологічні властивості збагаченого тромбоцитами фібринового матриксу, штучного біополімеру Nubiplant та їх суміші шляхом оцінки життєздатності та морфологічних характеристик клітин пульпозного ядра міжхребцевих дисків щурів, а також рівня експресії хондрогенних маркерних генів при культивуванні цих клітин за наявності зазначених матриксів.

Матеріали і методи

Аналізували життєздатність та морфологічні характеристики клітин ПЯ щурів, а також рівень експресії генів хондрогенних маркерів у суспензії клітин на 3-тю, 7-му та 14-ту добу.

Дослідження проведено відповідно до принципів біоетики, регламентованих Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей (1986), Директивою 2010/63/ЄС "Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях" (2010), Законом України №3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" (2006). Проведення дослідження затверджене комісією за питань етики та біоетики Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України (протокол №3 від 4 травня 2018 р.).

У роботі використовували: набори для виділення рибонуклеїнових кислот (РНК) ("Рибо-сорб", "АмпліПрайм"), проведення класичної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) "PCR-core" (GENPAQ), зворотної транскрипції "RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit" (Fermentas), синтетичні праймери для проведення ПЛР (Fermentas), агарозу (AMRESCO), Трилон-В (Riedel-de Haen), Трис (AMRESCO), етидіуму бромід (Sigma), внутрішньотканинний трансплантат Nubiplant™ (Intrernational Center for Medical Technology Implementation, Україна).

Дизайн дослідження

Отримання ЗТФМ

Зі свіжоотриманих зразків крові виділяли збагачену тромбоцитами плазму (близько $1,0 \cdot 10^6$ /мкл) шляхом подвійного центрифугування, потім отримували ЗТФМ за допомогою активатора згортання SiO_2 .

Отримання суспензії клітин пульпозного ядра

Забій тварин здійснювали з використанням анестезії кетаміном та сибазоном. Хвостовий відділ хребта щурів звільняли від шкіри та оболонки, промивали фізіологічним розчином з антибіотиком та антимікотиком у дозі 10 мкл/мл (РАА, Австрія). В стерильних умовах виділяли пульпозні ядра, суспендували їх у фізіологічному розчині шляхом механічного піпетування. Підраховували чисельність живих клітин із застосуванням трипанового синього (Janssen Chemica, Бельгія). Клітини ПЯ ресуспендували у поживному середовищі, яке містило DMEM (Biowest, Франція), збагаченому 5% сироваткою великої рогатої худоби (Biowest, Франція). Одну серію зразків одразу кріоконсервували для визначення показників вихідного контролю.

Культивування клітин пульпозного ядра

Для різних серій експерименту застосовували три види матриксів – ЗТФМ, Nubiplant або їх суміш у співвідношенні 1:1. Смужку матриксу кожного виду розміром 5x30 мм розміщали в чашці Петрі відповідного діаметра таким чином, щоб утворилася перетинка по всій довжині. Суспензію клітин наносили на одну половину культуральної чашки вздовж матриксу і спостерігали за розселенням клітинної популяції. Зразки для культивування містили близько $1,4 \cdot 10^6$ клітин ПЯ. Культивування проводили протягом 3, 7 та 14 діб у стандартних культуральних умовах ($t = 37^\circ\text{C}$, $\text{CO}_2 = 5\%$, вологість – 95%) в інкубаторі EC-160 (Nüve, Турція) без (контрольна група) або з додаванням ЗТФМ, гідрогелю Nubiplant або суміші ЗТФМ і Nubiplant (експериментальні групи). Заміну поживного середовища здійснювали 1 раз на 3-4 доби.

Спостереження за живою культурою проводили в пограничній з матриксом зоні в межах одного поля зору з допомогою інвертованого мікроскопа (Nicon TS100, Японія). По закінченні культивування кожної серії експерименту культуральний матеріал кріоконсервували для подальших досліджень (ПЛР), попередньо підраховували вміст живих клітин.

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

Експресію генів колагену II (COL II), агрекану (ACAN), гліпікану (GPC3), анексину (ANXA3), плеотрофіну (PTN), матриксного протеїну gla (MGP) та віментину (VIM) в культурі клітин ПЯ щурів визначали методом ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Реакцію зворотної транскрипції проводили з використанням набору "RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit" (Fermentas). Як контрольний ген використовували ген гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогенази (GAPDH). Для проведення ПЛР використовували ампліфікатор "Терцик" ("ДНК-технологія") та набір для проведення класичної ПЛР "PCR-core" (GENPAQ).

Для визначення експресії генів застосовували такі праймери: для гена COL II – 5'-caccgctaactccagatgac-3' та 5'-ggaaggcgtgaggtctctgt-3', для гена ACAN – 5'-ccactggagaggactgtag-3' і 5'-ggtctgtgcaagtgttcgag-3' [21], для гена GPC3 – 5'-ggcctgagccagtgtt-3' та 5'-tttaccctgggacagacat-3', для гена PTN – 5'-ctcagagatgtaagatcccttgca-3' і 5'-caagcctggaactggtatttgc-3', для гена VIM – 5'-gcacctgagtcattcaga-3' та 5'-gcaaggattccatttacttca-3', для гена ANXA3 – 5'-gtggaagagacgaaagcctgaa-3' і 5'-atccgtgccccattttct-3', для гена MGP – 5'-gctcctctggccatcct-3' та 5'-ttcatgcttctgtgagattcata-3' [22], для гена GAPDH – 5'-ggggctctctgctcctccc-3' і 5'-caggcgtccgatacggcga-3' [23]. Сорок циклів ампліфікації проведено за температури відпалу 60°C .

Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі. Рівень експресії визначали за інтенсивністю електрофоретичних сигналів досліджуваних та контрольного генів з використанням програмного забезпечення для аналізу зображень "ViTran". Нормалізацію даних інтенсивності електрофоретичних сигналів проводили щодо інтенсивності відповідних сигналів GAPDH.

Статистичний аналіз

Для визначення статистичної значущості різниці між показниками досліджуваної та контрольної груп використовували t-критерій Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Дослідження життєздатності клітин пульпозного ядра та їх морфологічних характеристик при культивуванні за наявності збагаченого тромбоцитами фібринового матриксу, Nubiplant або їх суміші

Для порівняння бар'єрних властивостей ЗТФМ, Nubiplant та їх суміші, а також їх толерантності до клітин ПЯ досліджували життєздатність (Табл. 1) та морфологічні характеристики (Рис. 1-3) ПЯ при

Таблиця 1. Життєздатність клітин пульпозного ядра (%) при культивуванні за наявності ЗТФМ, Nubiplant або суміші ЗТФМ і Nubiplant

Матрикс	Термін культивування, доба		
	3	7	14
Контроль	38,0±5,3	33,0±6,6	25,3±5,5
ЗТФМ p (t-test)*	79,0±10,1 0,018	83,0±9,8 0,008	77,0±12,5 0,016
ЗТФМ + Nubiplant p (t-test)*	67,0±6,1 0,011	64,0±9,6 0,017	58,0±7,5 0,013
Nubiplant p (t-test)*	49,7±5,52 0,029	54,3±9,3 0,029	52,0±12,5 0,057

Примітка: * – порівняно з контролем.

культивуванні протягом 3, 7 та 14 діб за наявності зазначених матриксів.

Суспензія клітин ПЯ, отримана із хвостового відділу хребта щурів, містила (58,0±0,5) % живих клітин.

Після культивування протягом 3 діб вміст живих клітин у контрольних зразках знижувався (див. Табл. 1). Популяція живих клітин була однорідною і складалася із окремо розташованих округлих бластоподібних клітин невеликого розміру, які інколи групувалися по 2-3 (див. Рис. 1, А). В експериментальних зразках відбувалася агрегація клітин у зоні безпосереднього межування з матриксами з боку нанесення. Спостерігали агрегати з 10-15 клітин (див. Рис. 1, Б-Г). У культурах із ЗТФМ та сумішшю ЗТФМ і Nubiplant кількість живих клітин перевищувала таку в контрольних зразках у 2,1 разу (p=0,018) та 1,8 разу (p=0,011) відповідно. В культурі клітин з Nubiplant кількість живих клітин перевищувала контрольний показник в 1,3 разу, але різниця не була статистично значущою.

На 7-му добу культивування кількість живих клітин у контрольних зразках зменшилася. В експериментальних зразках із додаванням ЗТФМ та суміші ЗТФМ і Nubiplant цей показник значно перевищував контрольні значення: в 2,5 разу (p=0,008) та 1,9 разу (p= 0,017) відповідно. Кількість живих клітин, які культивували за наявності матриксу Nubiplant, також перевищувала контрольні показники. Клітини в культуральних зразках мали морфологічні ознаки хондроцитів: збільшувався об'єм цитоплазми, набуваючи овальної та округлої форми, спостерігали велике, асиметрично розташоване ядро та відсут-

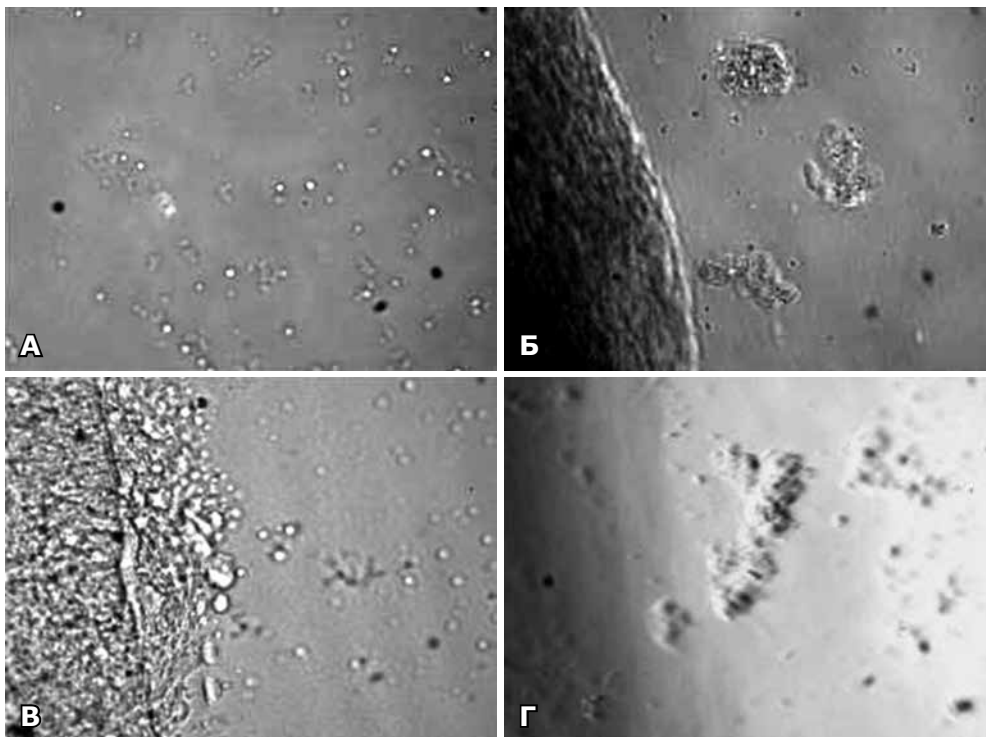


Рис. 1. Культура клітин пульпозного ядра. Живий незабарвлений препарат, зона безпосереднього контакту з матриксами, 3-тя доба культивування: А – контроль; Б – збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс; В – збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс і Nubiplant; Г – Nubiplant. $\times 100$

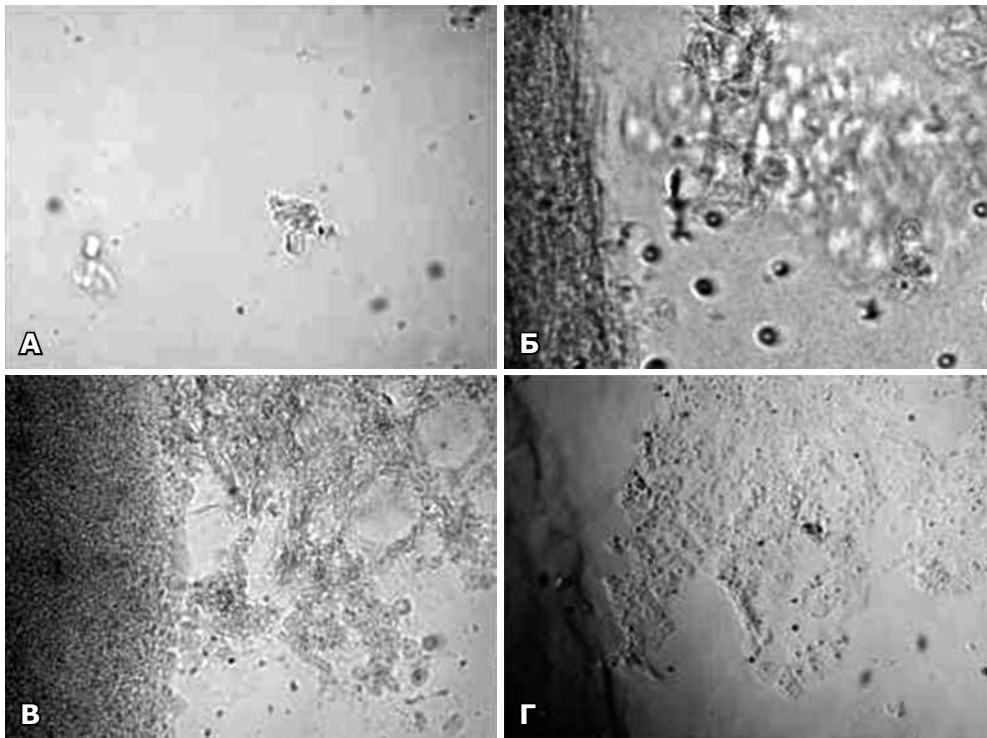


Рис. 2. Культура клітин пульпозного ядра. Живий незабарвлений препарат, зона безпосереднього контакту з матриксами, 7-ма доба культивування: А – контроль, Б – збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс; В – збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс і Nubiplant; Г – Nubiplant. ×100

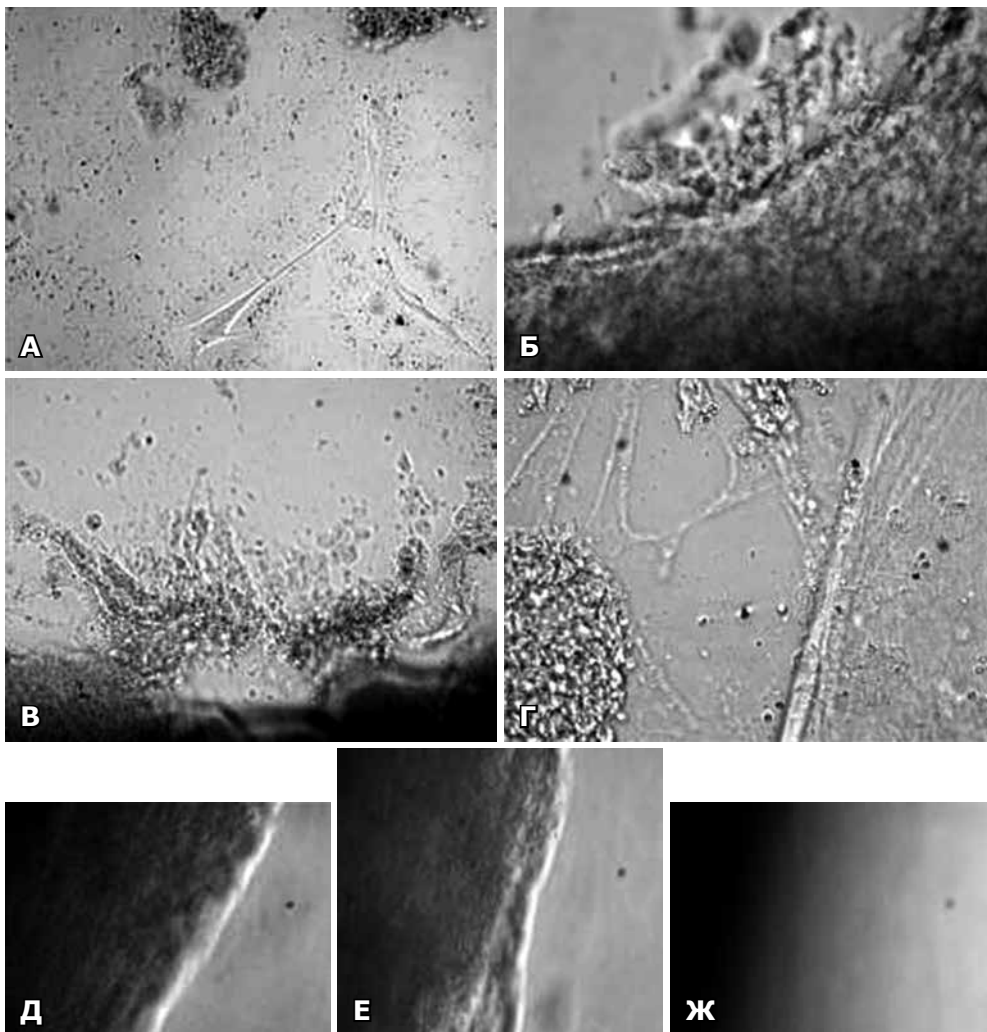


Рис. 3. Культура клітин пульпозного ядра. Живий незабарвлений препарат, зона безпосереднього контакту з матриксами, 14-та доба культивування: А – контроль; Б – збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс; В – збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс і Nubiplant; Г – Nubiplant; протилежний бік матриксів: Д – збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс; Е – збагачений тромбоцитами фібриновий матрикс і Nubiplant; Ж – Nubiplant. ×100

ність відростків (див. **Рис. 2**). Клітини утворювали агрегати із 10–15 клітин, які поєднувалися, утворюючи спільний екстраклітинний матрикс. Якщо в контрольних зразках ці агрегати розташовувалися рівномірно по культуральній площині (див. **Рис. 2, А**), то в експериментальних культурах відзначено їх тропність до зовнішнього шару матриксу, а у разі застосування Nubiplant – їх проникнення всередину матриксу (див. **Рис. 2, Б–Г**). У культурах з Nubiplant та сумішшю ЗТФМ і Nubiplant ці клітини морфологічно відрізнялись: вони мали видовжену форму цитоплазми та довгі відростки, які, проростаючи у матрикс, формували тяжі, тобто мали фібробластоподібну морфологію.

На 14-ту добу культивування фракція живих клітин у контрольних зразках зменшилася, в експериментальних – перевищувала контрольні показники. В контрольних зразках спостерігали часткову деградацію колоній клітин хондроцитоподібної морфології, клітини втрачали адгезивні властивості, з'являлися зони некрозу (див. **Рис. 3, А**). На відміну від контрольних зразків, у зразках із ЗТФМ колонії клітин формували щільні контакти з матриксом (див. **Рис. 3, Б**). Всередині матриксу спостерігали клітини фібробластоподібної морфології. Зберігалися великі колонії хондроцитоподібних клітин при застосуванні Nubiplant та суміші ЗТФМ і Nubiplant (див. **Рис. 3, В, Г**). Фіброзні тяжі всередині цих матриксів збільшувалися та розгалужувалися.

У цей термін у жодному з досліджуваних матриксів виселення клітин на протилежний бік не спостерігали, тобто ЗТФМ, Nubiplant та їх суміш можуть виконувати бар'єрні функції щодо утримання клітинної популяції в певній ділянці (див. **Рис. 3, Д–Ж**).

Дослідження експресії генів хондрогенних маркерів у клітинах пульпозного ядра *in vitro*

Для дослідження впливу ЗТФМ та гідрогелю Nubiplant на функціональні властивості клітин пульпозного ядра проведено молекулярно-генетичні дослідження культуральної популяції клітин експериментальних зразків (з додаванням ЗТФМ, гідрогелю Nubiplant або суміші ЗТФМ і Nubiplant) порівняно з контрольними (без додавання матриксів). Визначали експресію генів – маркерів хондрогенних клітин та хрящового екстраклітинного матриксу: COL II, ACAN, GPC3, ANXA3, PTN, MGP та VIM клітинами ПЯ *in vitro*. Вибір цих генів зумовлений структурно-функціональним значенням їх продуктів для структур МХД – ПЯ та фіброзного кільця, а також даними щодо зниженого рівня експресії цих білків клітинами ПЯ, яке дегенерує [24–28].

Отримані результати свідчать, що експресія всіх досліджуваних генів у суспензії клітин ПЯ на 3-тю добу культивування знижувалася порівняно з експресією клітинами вихідної суспензії ПЯ або не визначалася взагалі (**Табл. 2**). На 7-му добу культивування спостерігали подальше зниження експресії: для генів ANXA3 та PTN виявлено мінімальний її рівень, для генів COL II, ACAN, GPC3 і MGP експресія не визначалася взагалі. На 14-ту добу культивування в клітинах ПЯ контрольної групи відзначено експресію лише одного із досліджуваних генів – VIM.

Установлено, що на 3-тю добу культивування в зразках зі смужкою ЗТФМ рівень експресії всіх досліджуваних генів зростав порівняно з контролем. На 7-му добу культивування рівень експресії генів VIM, ANXA3, PTN, MGP був вищий за такий у контрольних зразках, а експресія генів COL II, ACAN та GPC3 не визначалася. На 14-ту добу додавання ЗТФМ підтримувало експресію двох генів – ANXA3 та MGP.

Уже на 3-тю добу відзначено активувальний вплив біоактивних речовин ЗТФМ на метаболічну активність хондроцитоподібних клітин, яка забезпечує сталість їх екстраклітинного оточення. Про це свідчить високий рівень експресії генів, задіяних у хондрогенезі та секреції екстраклітинного матриксу хрящової тканини, зокрема колагену II типу, агрекану, гліпікану – основних маркерів функціонування клітин ПЯ, які забезпечують осмотичну рівновагу структур МХД; гепаринзв'язувального білка плеотрофіну, віментину та анексину-3 – важливих маркерів, характерних для розвитку хондроцитів; матриксних білків родини Gla (кодуються геном MGP), котрі інгібують кальцифікацію хряща [29–32].

У зразках, культивування яких проводили за наявності суміші ЗТФМ і Nubiplant, у більшості випадків спостерігали подібну до такої в зразках із ЗТФМ динаміку експресії генів, але в деяких випадках рівень експресії окремих генів був дещо нижчим порівняно зі зразками, в культуральне середовище яких додавали ЗТФМ без гідрогелю, але вплив ЗТФМ у поєднанні з Nubiplant щодо деяких маркерів був більш пролонгований у часі.

При культивуванні клітин ПЯ з додаванням гідрогелю Nubiplant протягом 3, 7 та 14 діб спостерігали підтримання експресії лише гена VIM близько до рівня контрольних значень. Експресію інших генів не визначено.

Отже, ЗТФМ має активувальний вплив на експресію клітинами генів хондрогенних маркерів, який можна пояснити наявністю в цьому матриксі тромбоцитів – депо біоактивних молекул, що робить ЗТФМ не лише матеріалом з бар'єрною функцією, а й активатором їх життєздатності та функціональної активності.

Висновки

1. Застосування ЗТФМ, Nubiplant або суміші ЗТФМ і Nubiplant при культивуванні клітин ПЯ продемонструвало відсутність виселення клітин на протилежний бік зазначених матриксів протягом періоду дослідження (14 діб).

2. Використання ЗТФМ, Nubiplant або суміші ЗТФМ і Nubiplant сприяло формуванню колоній клітин хондроцитоподібної морфології у зоні безпосереднього межування з матриксами та підтримувало життєздатність клітин протягом усього досліджуваного періоду, тоді як у контрольних зразках на 14-ту добу культивування спостерігали некротичні процеси.

3. Застосування ЗТФМ та суміш ЗТФМ і Nubiplant сприяло підтриманню експресії хондрогенних генів клітинами ПЯ в пограничній з матриксами зоні.

4. Отримані результати свідчать про позитивну дію ЗТФМ на клітини ПЯ та його бар'єрні функції, що є перспективним для застосування ЗТФМ з метою запобігання формуванню рубцево-спайкових процесів.

Таблиця 2. Експресія генів у культурі клітин пульпозного ядра за наявності ЗТФМ, Nubiplant або суміші ЗТФМ і Nubiplant

Термін культивування	Контроль	ЗТФМ	ЗТФМ + Nubiplant	Nubiplant
COL II				
Нативна суспензія	++	-	-	-
3-тя доба	0	+	0	0
7-ма доба	0	0	0	0
14-та доба	0	0	0	0
ACAN				
Нативна суспензія	+++	-	-	-
3-тя доба	+	+++	+++	0
7-ма доба	0	0	0	0
14-та доба	0	0	0	0
VIM				
Нативна суспензія	+++	-	-	-
3-тя доба	++	+++	+++	++
7-ма доба	+++	+++	+++	+++
14-та доба	+++	0	0	++
ANXA3				
Нативна суспензія	+++	-	-	-
3-тя доба	0	++	++	0
7-ма доба	+	++	++	0
14-та доба	0	+	0	0
GPC3				
Нативна суспензія	+++	-	-	-
3-тя доба	+	++	++	0
7-ма доба	0	0	++	0
14-та доба	0	0	0	0
PTN				
Нативна суспензія	+++	-	-	-
3-тя доба	0	++	+	0
7-ма доба	+	++	0	0
14-та доба	0	0	0	0
MGP				
Нативна суспензія	++	-	-	-
3-тя доба	+	+++	+	0
7-ма доба	0	++	+	0
14-та доба	0	+	+	0

Розкриття інформації*Конфлікт інтересів*

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Етичні норми

Дослідження проведено відповідно до принципів біоетики, регламентованих Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей (1986), Директивою 2010/63/ЄС "Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях" (2010), Законом України №3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" (2006). Проведення дослідження затвер-

джене комісією з питань етики та біоетики Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України (протокол №3 від 4 травня 2018 р.).

Фінансування

Дослідження не мало спонсорської підтримки.

References

1. Khyzhnyak MV, Bodnarchuk YuA. [The instable thoracolumbar spine fractures, modern methods of management]. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2012;(4):6-10. Ukrainian. doi: 10.25305/unj.55640
2. Osterman H, Seitsalo S, Karppinen J, Malmivaara A. Effectiveness of microdiscectomy for lumbar disc herniation: a randomized controlled trial with 2 years of follow-up. Spine

- (Phila Pa 1976). 2006 Oct 1;31(21):2409-14. doi: 10.1097/01.brs.0000239178.08796.52. PMID: 17023847.
3. Chan CW, Peng P. Failed back surgery syndrome. *Pain Med.* 2011 Apr;12(4):577-606. doi: 10.1111/j.1526-4637.2011.01089.x. PMID: 21463472.
 4. Coskun E, Süzer T, Topuz O, Zencir M, Pakdemirli E, Tahta K. Relationships between epidural fibrosis, pain, disability, and psychological factors after lumbar disc surgery. *Eur Spine J.* 2000 Jun;9(3):218-23. doi: 10.1007/s005860000144. PMID: 10905440; PMCID: PMC3611400.
 5. Sae-Jung S, Jirarattanaphochai K, Sumananont C, Wittayapairoj K, Sukhonthamarn K. Interrater Reliability of the Postoperative Epidural Fibrosis Classification: A Histopathologic Study in the Rat Model. *Asian Spine J.* 2015 Aug;9(4):587-94. doi: 10.4184/asj.2015.9.4.587. PMID: 26240719; PMCID: PMC4522450.
 6. Tural Emon S, Somay H, Orakdogan M, Uslu S, Somay A. Effects of hemostatic polysaccharide agent on epidural fibrosis formation after lumbar laminectomy in rats. *Spine J.* 2016 Mar;16(3):414-9. doi: 10.1016/j.spinee.2015.11.014. PMID: 26582488.
 7. Gürer B, Kahveci R, Gökçe EC, Ozevren H, Turkoglu E, Gökçe A. Evaluation of topical application and systemic administration of rosuvastatin in preventing epidural fibrosis in rats. *Spine J.* 2015 Mar 1;15(3):522-9. doi: 10.1016/j.spinee.2014.10.018. PMID: 25452015.
 8. Karanci T, Kelten B, Karaoglan A, Cinar N, Midi A, Antar V, Akdemir H, Kara Z. Effects of 4% Icodextrin on Experimental Spinal Epidural Fibrosis. *Turk Neurosurg.* 2017;27(2):265-271. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.15079-15.1. PMID: 27593771.
 9. Mohi Eldin MM, Abdel Razek NM. Epidural Fibrosis after Lumbar Disc Surgery: Prevention and Outcome Evaluation. *Asian Spine J.* 2015 Jun;9(3):370-85. doi: 10.4184/asj.2015.9.3.370. PMID: 26097652; PMCID: PMC4472585.
 10. Zhang C, Kong X, Ning G, Liang Z, Qu T, Chen F, Cao D, Wang T, Sharma HS, Feng S. All-trans retinoic acid prevents epidural fibrosis through NF- κ B signaling pathway in post-laminectomy rats. *Neuropharmacology.* 2014 Apr;79:275-81. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.010. Erratum in: *Neuropharmacology.* 2020 Aug 1;172:107927. PMID: 24316159.
 11. Xu H, Liu C, Sun Z, Guo X, Zhang Y, Liu M, Li P. CCN5 attenuates profibrotic phenotypes of fibroblasts through the Smad6-CCN2 pathway: Potential role in epidural fibrosis. *Int J Mol Med.* 2015 Jul;36(1):123-9. doi: 10.3892/ijmm.2015.2190. PMID: 25901787; PMCID: PMC4494601.
 12. Chen F, Wang C, Sun J, Wang J, Wang L, Li J. Salvianolic acid B reduced the formation of epidural fibrosis in an experimental rat model. *J Orthop Surg Res.* 2016 Nov 16;11(1):141. doi: 10.1186/s13018-016-0475-x. PMID: 27852325; PMCID: PMC5112727.
 13. Theys T, Van Hoylandt A, Broeckx CE, Van Gerven L, Jonkergouw J, Quirynen M, van Loon J. Plasma-rich fibrin in neurosurgery: a feasibility study. *Acta Neurochir (Wien).* 2018 Aug;160(8):1497-1503. doi: 10.1007/s00701-018-3579-8. PMID: 29872915.
 14. García M.C. Drug delivery systems based on nonimmunogenic biopolymers. In: Parambath A., editor. *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems.* Elsevier; 2018. p.317-344.
 15. Kardos D, Hornyák I, Simon M, Hinsenkamp A, Marschall B, Várdai R, Kállay-Menyhárd A, Pinke B, Mészáros L, Kuten O, Nehrer S, Lacza Z. Biological and Mechanical Properties of Platelet-Rich Fibrin Membranes after Thermal Manipulation and Preparation in a Single-Syringe Closed System. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 1;19(11):3433. doi: 10.3390/ijms19113433. PMID: 30388866; PMCID: PMC6274993.
 16. Wu I, Elisseff J. Biomaterials and Tissue Engineering for Soft Tissue Reconstruction. In: Laurencin C, Deng M, editors. *Natural and synthetic biomedical polymers.* Newnes; 2014 Jan 21. Elsevier; 2014;235-41. doi: 10.1016/b978-0-12-396983-5.00015-6
 17. Oh JH, Kim HJ, Kim TI, Woo KM. Comparative evaluation of the biological properties of fibrin for bone regeneration. *BMB Rep.* 2014 Feb;47(2):110-4. doi: 10.5483/bmbrep.2014.47.2.156. PMID: 24257120; PMCID: PMC4163896.
 18. Wang ZS, Feng ZH, Wu GF, Bai SZ, Dong Y, Chen FM, Zhao YM. The use of platelet-rich fibrin combined with periodontal ligament and jaw bone mesenchymal stem cell sheets for periodontal tissue engineering. *Sci Rep.* 2016 Jun 21;6:28126. doi: 10.1038/srep28126. PMID: 27324079; PMCID: PMC4914939.
 19. Alston SM, Solen KA, Sukavaneshvar S, Mohammad SF. In vivo efficacy of a new autologous fibrin sealant. *J Surg Res.* 2008 May 1;146(1):143-8. doi: 10.1016/j.jss.2007.08.006. PMID: 18279893.
 20. Bissell L, Tibrewal S, Sahni V, Khan WS. Growth factors and platelet rich plasma in anterior cruciate ligament reconstruction. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2015;10(1):19-25. doi: 10.2174/1574888x09666140710102002. PMID: 25012741.
 21. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008 Aug;17(4):761-73. doi: 10.1089/scd.2007.0217. PMID: 18393634.
 22. Lee CR, Sakai D, Nakai T, Toyama K, Mochida J, Alini M, Grad S. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine J.* 2007 Dec;16(12):2174-85. doi: 10.1007/s00586-007-0475-y. PMID: 17786487; PMCID: PMC2140128.
 23. Bertrand RL, Senadheera S, Tanoto A, Tan KL, Howitt L, Chen H, Murphy TV, Sandow SL, Liu L, Bertrand PP. Serotonin availability in rat colon is reduced during a Western diet model of obesity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 Aug 1;303(3):G424-34. doi: 10.1152/ajpgi.00048.2012. PMID: 22595993.
 24. Chen S, Hu ZJ, Zhou ZJ, Lin XF, Zhao FD, Ma JJ, Zhang JF, Wang JY, Qin A, Fan SW. Evaluation of 12 Novel Molecular Markers for Degenerated Nucleus Pulposus in a Chinese Population. *Spine (Phila Pa 1976).* 2015 Aug 15;40(16):1252-60. doi: 10.1097/BRS.0000000000000929. PMID: 25893345.
 25. Massey CJ, van Donkelaar CC, Vresilovic E, Zavaliangos A, Marcolongo M. Effects of aging and degeneration on the human intervertebral disc during the diurnal cycle: a finite element study. *J Orthop Res.* 2012 Jan;30(1):122-8. doi: 10.1002/jor.21475. PMID: 21710607.
 26. Vo NV, Hartman RA, Patil PR, Risbud MV, Kleitsas D, Iatridis JC, Hoyland JA, Le Maitre CL, Sowa GA, Kang JD. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs. *J Orthop Res.* 2016 Aug;34(8):1289-306. doi: 10.1002/jor.23195. PMID: 26890203; PMCID: PMC4988945.
 27. Vynios DH. Metabolism of cartilage proteoglycans in health and disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:452315. doi: 10.1155/2014/452315. PMID: 25105124; PMCID: PMC4106107.
 28. Schloer S, Pajonczyk D, Rescher U. Annexins in Translational Research: Hidden Treasures to Be Found. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 15;19(6):1781. doi: 10.3390/ijms19061781. PMID: 29914106; PMCID: PMC6032224.
 29. Xu C, Zhu S, Wu M, Han W, Yu Y. Functional receptors and intracellular signal pathways of midkine (MK) and pleiotrophin (PTN). *Biol Pharm Bull.* 2014;37(4):511-20. doi: 10.1248/bpb.b13-00845. PMID: 24694599.
 30. Vo NV, Hartman RA, Patil PR, Risbud MV, Kleitsas D, Iatridis JC, Hoyland JA, Le Maitre CL, Sowa GA, Kang JD. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs. *J Orthop Res.* 2016 Aug;34(8):1289-306. doi: 10.1002/jor.23195. PMID: 26890203; PMCID: PMC4988945.
 31. Vynios DH. Metabolism of cartilage proteoglycans in health and disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:452315. doi: 10.1155/2014/452315. PMID: 25105124; PMCID: PMC4106107.
 32. Schloer S, Pajonczyk D, Rescher U. Annexins in Translational Research: Hidden Treasures to Be Found. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 15;19(6):1781. doi: 10.3390/ijms19061781. PMID: 29914106; PMCID: PMC6032224.