

УДК 611.018.46+611.018.28:57.086.13:577.11.032
doi:10.22494/cot.v5i2.75

Порівняльне дослідження впливу bFGF та плазми, збагаченої факторами росту, на кріоконсервовані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини з кісткового мозку та сухожильної тканини щурів



Волкова Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

e-mail: volkovana781@gmail.com

РЕЗЮМЕ

МЕТА – дослідити *in vitro* вплив факторів росту, які відомі як стимулятори проліферації клітин, для визначення найбільш підходящого агенту для посилення проліферативної та міграційної активності кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), отриманих з кісткового мозку та сухожильної тканини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. ММСК отримували з кісткового мозку та сухожильної тканин щурів. Кріоконсервування здійснювали під захистом 10 % ДМСО з додаванням 20 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби зі швидкістю охолодження 1 °C/хв до -80 °C і подальшим зануренням у рідкий азот. При культивуванні кріоконсервованих ММСК використовували фактор росту фібробластів bFGF та плазму, збагачену факторами росту. Оцінювали здатність до проліферації (МТТ-тест), міграції (швидкість заповнення дефекту моношару) та синтезу колагену I типу (імуноцитохімічне визначення експресії колагену I типу).

РЕЗУЛЬТАТИ. Застосування плазми, збагаченої факторами росту, сприяє збільшенню здатності до проліферації та міграції кріоконсервованих ММСК з кісткового мозку у поєднанні зі зниженням відносної кількості клітин, які синтезують колаген I. Кріоконсервовані культури ММСК з сухожильної тканини виявляють більшу чутливість до впливу bFGF, ніж до плазми, збагаченої факторами росту, що має прояв у збільшенні здатності до проліферації та міграції клітин.

ВИСНОВКИ. bFGF та збагачена факторами росту плазма можуть бути використані як стимулюючі агенти для культур клітин стромального походження.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини; кістковий мозок; сухожильна тканина; основний фактор росту фібробластів; збагачена факторами росту плазма

Репаративно-регенеративні процеси в сухожиллях потребують набагато більше часу, ніж в інших сполучних тканинах, що пов'язано з їх гіпоклітинною та гіповаскулярною структурою [1]. Тому розробка нових біотехнологічних підходів, спрямованих на прискорення відновлення сухожилля, буде сприяти скороченню термінів тимчасової

втрати працездатності та зниженню рівня інвалідності хворих після травм опорно-рухового апарату.

На сьогодні одним з ефективних інструментів регенеративної медицини є використання факторів росту, що продукуються багатьма клітинами, а також самих клітин, вирощених *in vitro*, зокрема

мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК). Виділення та культивування клітин мезенхімального походження з органів і тканин є першим етапом отримання матеріалу для використання в регенеративній медицині з метою терапії патології різного генезу: захворювань опорно-рухового апарату, неврологічних, гінекологічних, серцево-судинних захворювань тощо [2-5]. Крім того, імуномодуючі властивості клітин мезенхімального походження можуть бути використані при аутоімунних захворюваннях [6] та для імунокорекції в трансплантології [7].

ММСК можуть сприяти регенерації не лише шляхом прямого диференціювання клітин, але і за рахунок секреції факторів росту, які є одними з найбільш важливих багатфункціональних молекул, що беруть участь в регенерації [8-10]. Так, наприклад, фактори росту фібробластів (FGF) є одними з ключових факторів, які можуть сприяти відновленню біомеханічних та структурних властивостей ушкоджених сухожиль [11]. Відомо, що й інші цитокіни підсилюють регенерацію сухожиль: трансформуючий фактор росту- β (TGF- β), основний фактор росту фібробластів (bFGF), фактор росту тромбоцитів (PDGF), інсуліноподібний фактор росту (IGF-1), епідермальний фактор росту (EGF) і фактор росту ендотелію судин (VEGF) [12].

Для підсилення ефекту дії ММСК *in vivo* та *in vitro* (прискорення швидкості відновлення тканини, проліферації та міграції клітин) необхідним є застосування додаткових компонентів, зокрема, зазначених факторів росту. Одним з їх основних джерел в організмі є кров, з якої сучасні біотехнологічні методи дозволяють отримати різні продукти: L-PRP (leucocyte and platelet-rich plasma) – плазму, збагачену тромбоцитами і лейкоцитами; P-PRP (pure platelet-rich plasma) – чисту збагачену тромбоцитами плазму; P-PRF (pure platelet-rich fibrin) – чистий збагачений тромбоцитами фібрин, L-PRF (leucocyte and platelet-rich fibrin) – збагачений тромбоцитами і лейкоцитами фібрин [13, 14]. Всі ці похідні містять у різному співвідношенні фактори росту: фактор росту гепатотів (HGF), TGF- β , PDGF, IGF-1, VEGF, EGF, thrombospondin 1 [15, 16]. Саме тому зазначені біотехнологічні препарати знайшли широке застосування в регенеративній медицині.

Застосування плазми, збагаченої факторами росту (ПЗФР), отриманої з P-PRP у модифікації [17], сприяє відновленню сухожильної та хрящової тканини [18, 19]. Крім того, з літератури відомо, що bFGF та ПЗФР здатні до стимуляції проліферації ММСК і регуляції їх диференціювання в теноцити [20]. В останні роки більш глибокі дослідження ПЗФР сприяли виявленню набагато складнішої системи взаємодій між факторами, що входять до її складу, та клітинами або тканинами-мішенями, на які вони впливають [21, 22]. Стало відомим, що ці фактори не тільки відповідають за складну сигнальну систему на рівні міжклітинних взаємодій, але й слугують проміжною ланкою між гормонами та цитокінами.

У попередній роботі ми досліджували морфо-функціональні характеристики кріоконсервованих ММСК, отриманих з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин, та встановили, що ММСК сухожильної тканини характеризувалися більшою здатністю до колонієутворення і проліферації та нижчою здатністю до спрямованого диференціювання, ніж ММСК з кісткового мозку та жирової тканини [23].

Для того щоб забезпечити базу для подальших досліджень в області регенеративної медицини, в даній роботі було проведено *in vitro* дослідження впливу фактору росту bFGF та ПЗФР, які відомі як стимулятори проліферації клітин, для визначення найбільш підходящого агенту для посилення проліферативної та міграційної активності ММСК, отриманих з кісткового мозку та сухожильної тканини, та створення у подальшому експериментальної системи оцінки при виборі найкращого джерела клітин для терапії ушкоджень опорно-рухового апарату.

За даними літератури, вміст bFGF в ПЗФР менший у порівнянні з іншими факторами росту, що є недостатнім для підсилення проліферативної активності клітин, якщо розглядати цей фактор окремо [18]. Однак ростові фактори, що входять до складу ПЗФР, залежно

від дози можуть примножувати ефект один одного та діяти синергічно [22]. У представленому *in vitro* дослідженні ми використовували аутологічну систему ПЗФР та ММСК для обґрунтування подальших досліджень *in vivo*. Також як індуктор проліферативної активності ММСК був застосований bFGF у концентрації 15 нг/мл [11, 20].

МЕТА РОБОТИ – дослідити *in vitro* вплив bFGF та збагаченої факторами росту плазми на проліферативну та міграційну активність кріоконсервованих ММСК, отриманих з кісткового мозку та сухожильної тканини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з міжнародними принципами біоетики з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006) та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.) [24].

ОТРИМАННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ ММСК З КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА СУХОЖИЛЬНОЇ ТКАНИНИ. ММСК кісткового мозку (ММСК-КМ) отримували з стегнових кісток нелінійних щурів масою 100-150 г ($n = 7$). Клітини виділяли шляхом промивання резектованих фрагментів (3-4 мм) кісток за допомогою розчину Хенкса з наступним пропусканням суспензії крізь голки з діаметром, що зменшувався. Наступний етап включав центрифугування при 1500 об/хв протягом 5 хв. Отриману суспензію клітин висівали на культуральні флакони площею 25 см² (PAA, Австрія) в кількості 10³ клітин/см² флакону.

Первинну суспензію клітин з сухожильної тканини отримували з біопатів шляхом ферментативної дезагрегації. Для цього зразки тканин промивали розчином Хенксу (PAA, Австрія) з гентаміцином (150 мкг/мл) (Фармак, Україна) та інкубували у розчині колагенази II типу (1,5 мг/мл) (ЛанЕко, Росія) при 37 °C протягом 18 год. Клітини виділяли з біопатів шляхом ресуспендування з наступним центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 3 хв. До осаду додавали середовище культивування та висівали в культуральні флакони з щільністю 1•10⁴ клітин/см².

Повне живильне середовище культивування в усіх випадках містило: середовище IMDM (PAA, Австрія), 10 % фетальної сироватки великої рогатої худоби (HyClone, США), 150 мкг/мл канаміцину (Фармак, Україна) та 5 мкг/мл амфотерицину Б (PAA, Австрія). Середовище культивування змінювали кожні 3 доби. У роботі були використані стандартні умови культивування з використанням CO₂-інкубатора (Sanyo, Японія) при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂. При досягненні моношару культури клітини субкультивували (0,25 % розчин трипсину та розчин Версену у співвідношенні 1:1). В дослідженні використовували культури ММСК 2-го пасажу.

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ММСК. Кріоконсервування культур ММСК здійснювали під захистом 10 % ДМСО (ЛанЕко, Росія) з додаванням 20 % фетальної сироватки великої рогатої худоби. Розчин кріопротектору готували на живильному середовищі. Отримані суспензії вміщували по 1 мл у кріопробірки Nunc® (Thermo Scientific, США). Швидкість охолодження складала 1 °C/хв до -80 °C з подальшим зберіганням у рідкому азоті [25]. Відігрів здійснювали на водяній бані при 40 °C до появи рідкої фази. Видалення кріопротектора проводили шляхом додаванням 1:9 розчину Хенкса (PAA, Австрія) з наступним центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 5 хв. При культивуванні досліджуваних культур після кріоконсервування застосовували такі ж умови, як і для початкових культур.

ОТРИМАННЯ ПЛАЗМИ, ЗБАГАЧЕНОЇ ФАКТОРАМИ РОСТУ. Цільну кров (2 мл) забирали з хвостової вени щурів, після чого центрифугували у стерильній пробірці протягом 8 хвилин при 1500 об/хв. Після пошарової стратифікації крові центрифугуванням в стерильних умовах за допомогою інсулінового шприца безпосередньо над шаром лейкоцитів забирали шар плазми, збагаченої факторами росту (0,2 мл) згідно зі стандартною методикою [17].

ЗАСТОСУВАННЯ ФАКТОРІВ РОСТУ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ММСК. Для визначення впливу рекомбінантного білка bFGF (*Sigma-Aldrich*, США) на морфологічні та проліферативні характеристики кріоконсервованих ММСК проводили їх культивування протягом 10 діб. Живильне середовище складалося з IMDM, 10 % фетальної сироватки корів, 15 нг/мл bFGF [11, 20, 26]. Контролем були культури кріоконсервованих ММСК, культивовані без використання фактору.

Для визначення впливу ПЗФР на морфологічні та проліферативні характеристики кріоконсервованих ММСК проводили культивування протягом 10 діб. Живильне середовище складалося з IMDM та 10 % ПЗФР. Контролем були культури кріоконсервованих ММСК, що культивувались без використання ПЗФР.

ОЦІНКА ПРОЛІФЕРАЦІЇ ММСК. В досліджених культурах ММСК кісткового мозку та сухожильної тканини з додаванням та без додавання факторів росту визначали проліферативну активність клітин на строках культивування 1, 3, 7 та 10 діб за допомогою МТТ-тесту [27]. Вимірювання оптичної щільності розчину формазану в супернатанті проводили на фотоколориметрі КФК-2-УХЛ4.2 при довжині хвилі 540 нм. Як контроль використовували культуральне середовище без клітин.

ОЦІНКА МІГРАЦІЇ ММСК. Здатність ММСК до міграції визначали за швидкістю заповнення дефекту моношару. Для цього ММСК у кількості $1,5 \cdot 10^5$ клітин на cm^2 висівали в 6-лункові планшети і культивували протягом 10 діб до утворення конфлюенту, після чого за допомогою пластикової лопатки проводили зіскріб моношару (розмір дефекту 20×10 мм). На 4-у та 7-у добу препарати клітин фіксували 4 % розчином параформальдегіду з наступним фарбуванням за Романовським-Гімза азуром-ІІ і еозином. За допомогою світлового мікроскопу проводили підрахунок кількості клітин в зоні дефекту на одиницю площі.

ОЦІНКА СИНТЕЗУ КОЛАГЕНУ І ТИПУ. Забарвлення культур ММСК на колаген І типу проводили з використанням моноклональних антитіл до COL-1 в титрі 1:2000 (*Sigma-Aldrich*, США, Cat. No. C2456) та CFTM488A (*Sigma-Aldrich*, США, Cat. No. SCJ4600014) згідно з інструкцією фірми виробника. Використовували параформальдегід-метанолову фіксацію культур клітин. Флуоресцентну мікроскопію препаратів проводили за допомогою конфокального скануючого мікроскопа LSM 510 Meta (*Carl Zeiss*, Німеччина). З метою візуалізації ядер клітин препарати додатково фарбували люмінесцентним барвником DAPI (*Sigma*, США) в концентрації 1 мкг/мл протягом 30 хв.

СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми MS Office Excel 2007 (*Microsoft*, США) та Statistika 8 (*StatSoft Inc.*, США). При нормальному розподілі змінних достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Результати представлені у вигляді середніх арифметичних та їх помилок ($M \pm m$), відмінності вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ММСК КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА СУХОЖИЛЬНОЇ ТКАНИНИ ПІД ВПЛИВОМ bFGF ТА ПЗФР

При культивуванні кріоконсервованих ММСК-КМ із bFGF та ПЗФР динаміка росту була схожою, але приріст клітин був вірогідно більшим при застосуванні ПЗФР на 3-ю та 7-у добу спостереження порівняно з bFGF (рис. 1). Так, на 7-у добу культивування ММСК-КМ з додаванням ПЗФР приріст клітин був більшим в 2,3 рази, при застосуванні bFGF – у 1,5 рази порівняно з контролем. На 10-у добу у культурі ММСК-КМ з додаванням ПЗФР приріст клітин був більшим в 1,3 рази, при застосуванні bFGF – у 1,2 рази порівняно з контролем.

Проліферативна активність кріоконсервованих ММСК сухожильної тканини (ММСК-СТ) при додаванні bFGF достовірно збільшувалась

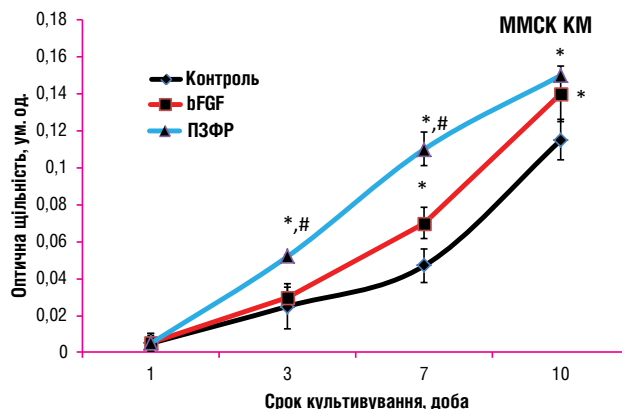


Рис. 1. Показники оптичної щільності культурального середовища за результатами МТТ-тесту в динаміці культивування ММСК-КМ з додаванням bFGF та ПЗФР ($n = 6$, $M \pm m$).

Примітки: * – вірогідно відносно контролю; $p < 0,05$; # – вірогідно відносно застосування bFGF, $p < 0,05$.

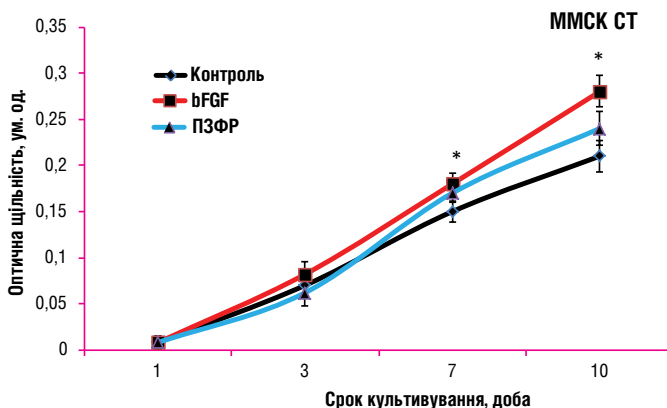


Рис. 2. Показники оптичної щільності культурального середовища за результатами МТТ-тесту в динаміці культивування ММСК-СТ з додаванням bFGF та ПЗФР ($n = 6$, $M \pm m$).

Примітка: * – вірогідно відносно контролю $p < 0,05$.

у 1,2 рази на 7-у добу та у 1,3 рази – на 10-у добу культивування порівняно з контролем (рис. 2). Використання ПЗФР не призводило до достовірних змін дослідженого показника стосовно контролю.

Таким чином, використання фактору bFGF та ПЗФР при культивуванні досліджених клітин призводило до достовірного збільшення їх проліферативної активності. Наші результати узгоджуються з даними інших авторів [28], в яких показано, що bFGF є потужним стимулятором ангиогенезу та регулятором клітинної міграції і проліферації, що створює передумови для використання цього фактору як терапевтичного агента для підвищення ефективності відновлення ушкоджених тканин.

МІГРАЦІЙНА АКТИВНІСТЬ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ММСК КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА СУХОЖИЛЬНОЇ ТКАНИНИ ПІД ВПЛИВОМ bFGF ТА ПЗФР

Міграційна здатність клітин чинить безпосередній вплив на ефективність, характер та швидкість регенерації ушкодженої тканини. Швидкість міграції залежить як від властивостей самих клітин, так і від мікрооточення, в якому вони знаходяться. Тому наступним етапом роботи було дослідження міграційної активності кріоконсервованих ММСК кісткового мозку та сухожильної тканини шляхом визначення швидкості заповнення дефекту моношару при культивуванні.

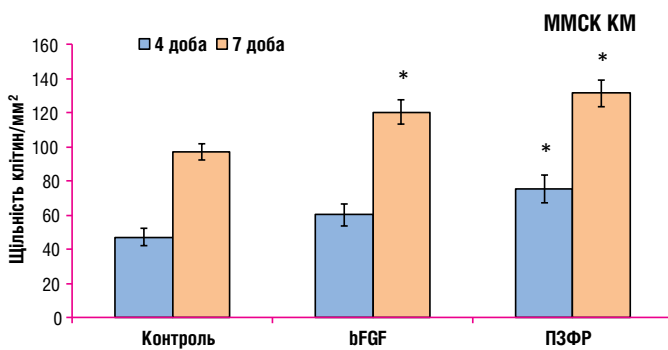


Рис. 3. Гістограми щільності клітин в зоні дефекту моношару культури MMCK-KM з додаванням bFGF та ПЗФР (n = 6, M ± m). Примітка: * – вірогідно відносно контролю p < 0,05.

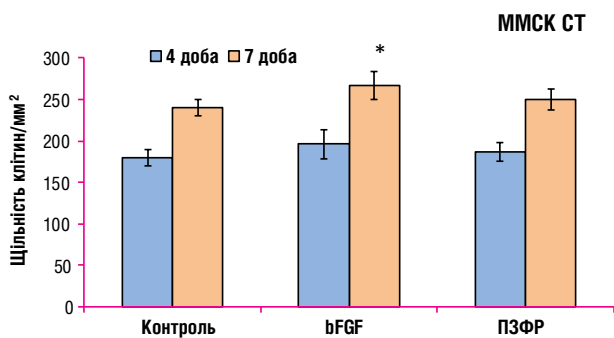


Рис. 4. Гістограми щільності клітин в зоні дефекту моношару культури MMCK-ST з додаванням bFGF та ПЗФР (n = 6, M ± m). Примітка: * – вірогідно відносно контролю p < 0,05.

Отримані результати (рис. 3) свідчили про вірогідне збільшення щільності клітин в зоні дефекту при культивуванні MMCK-KM з застосуванням ПЗФР в 1,6 разу на 4-у добу та в 1,4 разу на 7-у добу відносно контролю. Застосування bFGF також підвищувало міграційну активність MMCK-KM на 7-у добу спостереження в 1,4 разу відносно контролю. Слід зазначити, що достовірних відмінностей на 7-у добу між групами із застосуванням bFGF та ПЗФР не спостерігали.

Результати визначення міграційної активності MMCK-ST при застосуванні факторів росту bFGF та ПЗФР наведені на рис. 4. На 4-у добу дослідження достовірних відмінностей між групами із застосуванням bFGF та ПЗФР відносно контролю не спостерігали. Застосування bFGF на 7-у добу призводило до вірогідного збільшення відносної кількості клітин в 1,2 разу відносно контролю.

СИНТЕЗ КОЛАГЕНУ І ТИПУ КРІОКОНСЕРВОВАНИМИ ММСК КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА СУХОЖИЛЬНОЇ ТКАНИНИ ПІД ВПЛИВОМ bFGF ТА ПЗФР

Культура MMCK-KM характеризувалася наявністю веретеноподібних та парусоподібних клітин, 89,6 ± 2,7 % яких були позитивно забарвлені на колаген I типу (рис. 5). У випадку застосування bFGF кількість клітин, позитивно забарвлених на колаген I типу, складала 90,4 ± 3,2 %. При застосуванні ПЗФР спостерігали зниження відносної кількості клітин, позитивно забарвлених на колаген I типу (74,2 ± 2,7 %, p < 0,05), що, ймовірно, пов'язано з підвищенням проліферативної активності клітин, яка, як відомо, призводить до зниження експресії генів колагену [29].

MMCK-ST при культивуванні мали веретеноподібну та трикутну форми з однорідною щільністю цитоплазми. Відносна кількість клітин,

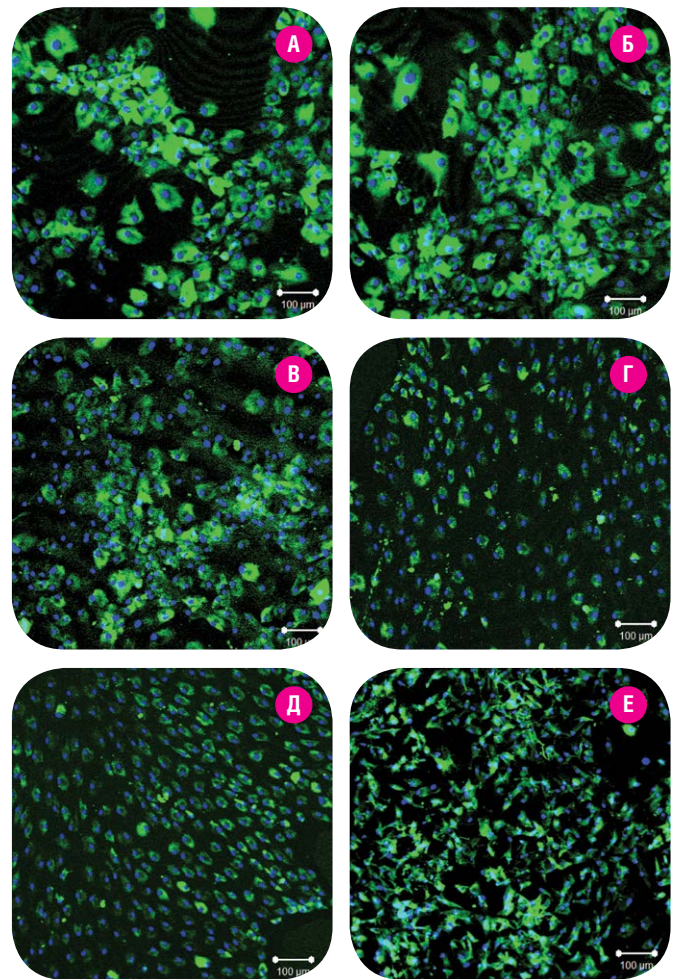


Рис. 5. Мікрофотографії культур MMCK-KM (А-В) та MMCK-ST (Г-Е) на 10-у добу культивування: контроль (А, Г), додавання bFGF (Б, Д), додавання ПЗФР (В, Е). Флуоресцентна мікроскопія, імунологічне забарвлення на колаген I типу (зелений колір), ядра забарвлені DAPI (блакитний колір).

що синтезували колаген I типу, в контролі складала 73,4 ± 2,5 %. Додавання bFGF не призводило до вірогідних змін дослідженого показника (73,2 ± 1,5 %). Застосування ПЗФР призводило до збільшення відносної кількості клітин, які були позитивно забарвлені на колаген I типу (82,1 ± 3,6 %, p < 0,05).

Отримання достатньої кількості клітинного матеріалу для відновлення ушкодженої тканини потребує, насамперед, розмноження клітин в культурі. Культивування є залежним від часу процесом, який є обмежувачим фактором на етапі проведення клітинної терапії. Пришвидження проліферації клітин при збереженні їх основних морфо-функціональних характеристик можливо завдяки застосуванню факторів росту. Як відомо, останні здатні регулювати клітинні функції аутокринним або паракринним шляхом. Вони ініціюють внутрішньоклітинні каскади трансдукції сигналу при зв'язуванні рецепторів тирозинкіназ з клітинною поверхнею. Було показано, що bFGF, PDGF та IGF-1 беруть активну участь в хемотаксисі, проліферації і диференціюванні сухожильних клітин, а також у формуванні позаклітинної матриці і регенераційних процесах. Встановлено, що застосування bFGF може прискорювати загоєння ушкодженої тканини підколінного сухожилля, швидше за все шляхом стимуляції проліферації фібробластів, активізації синтезу колагену та збільшення щільності клітин в сухожиллях над-

колінника [30]. Інші дослідження *in vitro* та *in vivo* показали, що bFGF також сприяє ангиогенезу і регулює міграцію клітин в сухожиллі [31].

Альтернативним способом отримання комплексу факторів росту, що беруть участь в регуляції клітинних функцій, може бути використання ПЗФР. Отримані Anitua E. та співавтор. результати свідчать, що застосування ПЗФР стимулює міграцію теноцитів і синовіальних фібробластів на 231,8 і 380,7 % відповідно в порівнянні з нативними нестимульованими клітинами [32]. Крім міграційної здатності ПЗФР значно збільшує проліферацію і адгезію фібробластів на матрицю колагену I типу [33]. В експериментах *in vitro* ПЗФР так само збільшує проліферацію, міграцію і хемотаксис остеобластів. Крім того, ПЗФР значно підсилює аутокринну експресію цими клітинами проангіогенних факторів (VEGF, HGF) і маркерів остеобластичної активності (проколагену I, остеокальцину, лужної фосфатази) [34].

Отже, для оптимізації проліферативної активності клітин, в залежності від поставленої мети, можна застосовувати як окремі рос-

тові фактори, так і їх комбінації. Нами було показано, що у випадку ММСК-КМ застосування ПЗФР призводить до підвищення їх проліферативної та міграційної активності, що поєднується зі зниженням відносної кількості клітин, які синтезують колаген I. При культивуванні ММСК-СТ навпаки – застосування bFGF активізує проліферацію та міграцію клітин у порівнянні з контролем без додавання фактору росту у середовище культивування.

Проведене дослідження слід розглядати як одну зі спроб визначення оптимального потенційного джерела ММСК у поєднанні з ростовими факторами для застосування в регенеративній медицині. Хоча в більшості випадків механізми, за допомогою яких трансплантовані клітини стимулюють регенерацію ушкоджених тканин, на даний момент залишаються недостатньо вивченими, отримані результати дають певний внесок в їх розуміння і можуть бути корисні у розробці терапевтичних стратегій для цілого ряду захворювань сухожильної тканини.

ВИСНОВКИ

1. **Культури кріоконсервованих клітин стромального походження, отриманих з кісткового мозку та сухожильної тканин щурів, зберігають *in vitro* здатність до проліферації, міграції та синтезу колагену I типу.**
2. **Застосування плазми, збагаченої факторами росту, сприяє збільшенню здатності до проліферації та міграції в культурах кріоконсервованих ММСК з кісткового мозку у поєднанні зі зменшенням відносної кількості клітин, які синтезують колаген I.**
3. **Культури кріоконсервованих ММСК з сухожильної тканини виявляють більшу чутливість до впливу фактору росту фібробластів, ніж до збагаченої факторами росту плазми, що має прояв у збільшенні здатності до проліферації та міграції клітин.**

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tozer S. Tendon and ligament: development, repair and disease / S. Tozer, D. Duprez // *Birth Defects Res C Embryo Today*. – 2005. – Vol. 75, № 3. – P. 226-236.
2. Кирик В. М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине (обзор литературы) / В. М. Кирик, Г. М. Бутенко // *Журнал Академії медичних наук України*. – 2010. – Т. 16, № 4. – С. 576-604.
3. Volkova N. Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells Stimulate Regeneration in an Intervertebral Disc / N. Volkova, M. Yukhta, A. Goltsev // *Biomedicines*. – 2015. – Vol. 3, № 3. – P. 237-247.
4. Effect of the bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells to the neural tissue after ischemic injury *in vitro* / O. A. Rybachuk, V. M. Kyryk, P. A. Poberezhny, et al. // *Cell and Organ Transplantation*. – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 74-78.
5. Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of murine ovaries / N. A. Volkova, M. S. Yukhta, T. A. Yurchuk, et al. // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 35-42.
6. Ra J. Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells / J. Ra, S. Kang, S. Shin // *J Transl Med*. – 2011. – Vol. 9, № 1. – P. 181-198.
7. Hegyi B. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall / B. Hegyi, B. Sagi1, J. Kovacs // *Int Immunology*. – 2010. – Vol. 22, № 7. – P. 551-559.
8. Graham R. Tendinopathy – from basic science to treatment / R. Graham // *Nature Clinical Practice Rheumatology*. – 2008. – Vol. 4, № 2 – P. 82-89.
9. Acellular dermal matrix loading with bFGF achieves similar acceleration of bone regeneration to BMP-2 via differential effects on recruitment, proliferation and sustained osteodifferentiation of mesenchymal stem cells / M. Du, T. Zhu, X. Duan, et al. // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. – 2016. – Vol. 70, №1. – P. 62-70.
10. Fibroblast growth factor 2 and platelet-derived growth factor, but not platelet lysate, induce proliferation-dependent, functional class II major histocompatibility complex antigen in human mesenchymal stem cells / C. Bocelli-Tyndall, P. Zajac, N. Di Maggio, et al. // *Arthritis Rheum*. – 2010. – Vol. 62, № 12. – P. 3815-3825.
11. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model / B. P. Chan, S. C. Fu, L. Qin, et al. // *Acta Orthopaedica Scandinavica*. – 2000. – Vol. 71, № 5. – P. 513-518.
12. Molloy T. The roles of growth factors in tendon and ligament healing / T. Molloy, Y. Wang, G. A. C. Murrell // *Sports Medicine*. – 2003. – Vol. 33, № 5. – P. 381-394.
13. Ehrenfest D. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) / D. Ehrenfest, L. Rasmusson, T. Albrektsson // *Trends Biotechnol*. – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 158-167.
14. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes / D. Ehrenfest, T. Bielecki, A. Mishra, et al. // *Curr Pharm Biotechnol*. – 2012. – Vol. 13, № 7. – P. 1131-1137.
15. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF-β1-induced myodifferentiation / E. Anitua, M. Sanchez, J. Merayo-Lloves, et al. // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 2011. – Vol. 52, № 9. – P. 6066-6073.
16. Basic characteristics of plasma rich in growth factors (PRGF): blood cell components and biological effects / K. Nishiyama, T. Okudera, T. Watanabe, et al. // *Clin Exp Dent Res*. – 2016. – Vol. 2, № 2. – P. 96-103.
17. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants / E. Anitua // *International journal of Oral and maxillofacial Implants*. – 1999. – Vol. 14, № 4. – P. 529-535.

18. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using PRGF / *M. Sanchez, J. Azofra, E. Anitua, et al.* // *Am J Sports Med.* – 2007. – **Vol. 35, № 2.** – P. 245–251.
19. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study / *M. Sanchez, E. Anitua, J. Azofra, et al.* // *Clin Exp Rheumatol.* – 2008. – **Vol. 26, № 5.** – P. 910-913
20. Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation / *M. A. Costa, C. Wu, B. V. Pham, et al.* // *Tissue engineering.* – 2006. – **Vol. 12, № 7.** – P. 1937-1943.
21. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields / *E. Anitua, M. Sanchez, G. Orive, et al.* // *Biomaterials.* – 2007. – **Vol. 28, № 31.** – P. 4551-4560.
22. *Anitua E.* Plasma rich in growth factors promotes dermal fibroblast proliferation, migration and biosynthetic activity / *E. Anitua, A. Pino, G. Orive* // *J Wound Care.* – 2016 – **Vol. 25, № 11.** – P. 680-687.
23. *Volkova N. A.* Morphological and functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose tissue and tendons / *N. A. Volkova, M. S. Yukhta, A. N. Goltsev* // *Cell and Organ Transplantology.* – 2016. – **Vol. 4, № 2.** – P. 200-205.
24. Council of Europe [France]. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 18.III.1986, <http://conventions.coe.int/treaty/en/Treaties/Word/123.doc>
25. *Volkova N.A.* Cryopreservation effect on proliferation and differentiation potential of cultured chorion cells / *N.A. Volkova, A.N. Goltsev* // *CryoLetters.* – 2015. – **Vol. 36, № 1.** – P. 25-29.
26. *Song G.* Growth and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells affected by type I collagen, fibronectin and bFGF / *G. Song, Y. Ju, H. Soyama* // *Materials Science and Engineering: C.* – 2008. – **Vol. 28, № 8.** – P. 1467-1471.
27. *Mossman T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / *T. Mossman* // *J Immunol Methods.* – 1983. – **Vol. 65, № 1-2.** – P. 55-63.
28. Different culture conditions affect the growth of human tendon stem/progenitor cells (TSPCs) within a mixed tendon cells (TCs) population / *M. Vigano, C. P. Orfei, A. Colombini, et al.* // *Journal of experimental orthopedics.* – 2017. – **Vol. 4, № 1.** – P. 8.
29. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons: an *in vitro* model of human tendon healing / *N. Maffulli, S. W. Ewen, S. W. Waterston, et al.* // *Am J Sports Med.* – 2000. – **Vol. 28, № 4.** – P. 499-505.
30. Effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model / *B. P. Chan, S. Fu, L. Qin, et al.* // *Acta Orthop Scand.* – 2000. – **Vol. 71.** – P. 513.
31. *Folkman J.* Angiogenic factors / *J. Folkman, M. Klagsbrun* // *Science.* – 1987 – **Vol. 235, № 4787.** – P. 442-447.
32. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid / *E. Anitua, M. Sanchez, M. de la Fuente, et al.* // *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* – 2012. – **Vol. 20, № 9.** – P. 1657-1665.
33. *Anitua E.* Plasma rich in growth factors promote gingival tissue regeneration by stimulating fibroblast proliferation and migration and by blocking transforming growth factor- β 1-induced myodifferentiation / *E. Anitua, M. Troya, G. Orive* // *Orive Periodontol.* – 2012. – **Vol. 83, № 8.** – P. 1028-1037.
34. Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration, and autocrine secretion in primary human osteoblasts / *E. Anitua, R. Tejero, M. M. Zalduendo, et al.* // *J Periodontol.* – 2013. – **Vol. 84, № 8.** – P. 1180-1190.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 09.09.2017 р.

Прийнята до друку 30.11.2017 р.

Робота виконана за підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства», договір № 2.2.6.94.