

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАН УКРАЇНИ**

БЛЕЦЬКА ПОЛІНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК: 617.735-08:612.649.011.87:615.014.41

**ЯДРОВІСНІ КЛІТИНИ КОРДОВОЇ КРОВІ В ЛІКУВАННІ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ РЕТИНОПАТІЇ З НЕОАНГІОГЕНЕЗОМ**

14.01.35 – кріомедицина

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Харків – 2015

Дисертація є рукописом.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,

лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки

Дьомін Юрій Альбертович,

завідувач кафедри офтальмології Харківської медичної

академії післядипломної освіти, МОЗ України, м. Харків

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор,

лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки

Заслужений діяч науки і техніки України

Шепітько Володимир Іванович,

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія»,

завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології, м. Полтава

доктор медичних наук, професор

Сергієнко Андрій Миколайович,

Медичний центр «Офтальмологічна клініка професора Сергієнка»

лікар-офтальмолог, м. Вінниця

Захист дисертації відбудеться «__» _____ 2015 р. о ____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розіслано «__» _____ 2015 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д64.242.01,

доктор біологічних наук, професор

Л. Ф. Розанов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На даний час розроблено технології та продовжують вивчатися біотехнологічні процеси консервування клітин та тканин в умовах низьких температур (Stiff P. J., 1987, Donaldson C., 1996, Когут Г. И., 1998, Richter E., 1998, Jarocho D., 2015).

Процеси кріоконсервування забезпечують структурно-функціональну повноцінність біологічного матеріалу та його подальше практичне використання. На сьогодні активно розвивається клітинна терапія – окремий напрямок у медицині (Rubinstein P., 1993, 1994, 1995; Campos L., 1995, Herold S., 1997, Matesanz R., 2012, Adibi A., 2015).

Використання кріоконсервованого біологічного матеріалу сприяє активації компенсаторних ресурсів пошкоджених клітин та тканин реципієнта, стимуляції механізмів регенерації, заміщенню втрачених тканинних структур та відновленню функцій клітин (Verfaillie C., 2002; Ватутин Н. Т., 2003; Кухарчук А. Л., 2004; Владимирская Е. Б., 2005; Preeti Chhabra, 2009; Matesanz R., 2012).

Препарати кріоконсервованої кордової крові позитивно впливають на клінічні прояви патологічних процесів, пов'язаних із неоангіогенезом (Sugie Y., 2005; Zhao X., 2006; Dahlmann-Noor A., 2010). В офтальмології найпоширенішими захворюваннями цієї групи, є діабетична ретинопатія, ексудативна форма вікової макулярної дегенерації, ретинопатія недоношених та неоваскуляризація сітківки (Zhao X., 2002; Sakaguchi D. S., 2004; Coles V. L., 2004; Baker P. S., 2009).

Традиційні методи лікування (термічна лазеркоагуляція, вітреоретинальна хірургія, інтравітреальне введення лікарських засобів) дозволяють лише зменшити ризик втрати зору (Zhao X., 2002), тому важливим є пошук найбільш ефективного патогенетично спрямованого методу лікування.

Відомо, що основними факторами-активаторами неоангіогенезу є родина факторів росту ендотелію судин – VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), а найголовнішим антиангіогенним фактором виступає фактор росту пігментного епітелію – PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor). Взаємодія та співвідношення цих факторів є критичним у новоутворенні судин (Gariano R. F., 2005).

Інтравітреальне введення інгібіторів VEGF не дає стійкого ефекту і потребує повторних маніпуляцій (Lutty G.A., 2011).

Кордова кров (КК), або пуповинна, є альтернативним кістковому мозку і периферичної крові джерелом стовбурових клітин (Gluckman E., 1997, Гольцев А.М., 1998, Rubinstein P., 1998, Стрижаков А.М., 2003, Бабійчук Л.О., 2008, 2009, 2010).

Застосування кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини (кЯКККЛ) в якості довготривалих агентів може стати провідним

методом лікування ретинопатії з неангіогенезом (Sakaguchi D. S., 2004; Dahlmann-Noor A., 2010).

З огляду на вищевикладене актуальною задачею медицини є розробка нових підходів у лікуванні хворих на ретинопатію з неангіогенезом з урахуванням впливу на патогенетичні механізми новоутворення судин і пролонгації антиангіогенного ефекту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є частиною науково-дослідної роботи відділу кріоморфології ІПКіК НАН України № 2.2.6.90: «Визначення механізмів модифікації структурних параметрів та метаболічного стану ядровмісних клітин кордової та еритроцитів донорської крові під впливом різних кріозахисних розчинів та низьких температур». (№ ДР 0114U001320).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи є вивчення механізмів дії кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини та їх впливу на структурно-функціональну характеристику сітківки ока експериментальних тварин із модельованою ретинопатією з неангіогенезом.

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні задачі.

1. Вивчити особливості патогенезу неоваскулярної патології сітківки, на основі одержаних результатів створити експериментальну модель ретинопатії з неангіогенезом.
2. Визначити експресію генів про- та антиангіогенного факторів у експериментальній моделі ретинопатії.
3. Дослідити морфологічні зміни сітківки ока тварин із модельованою патологією.
4. Визначити ефективність інтравітреального введення кЯКККЛ.
5. Дослідити динамічні зміни експресії генів про- і антиангіогенних факторів у групах експериментальних тварин після введення кЯКККЛ.
6. Вивчити морфологічні зміни в сітківці ока тварин у динаміці експерименту та після введення кЯКККЛ.
7. Експериментально обґрунтувати лікування ретинопатії з неангіогенезом за допомогою кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини.

Об'єкт дослідження – процеси блокування неангіогенезу сітківки після введення препарату кріоконсервованої кордової крові.

Предмет дослідження – механізми дії кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини, які зумовлюють терапевтичну ефективність лікування ретинопатії із неангіогенезом.

Методи дослідження: офтальмологічні – для оцінки стану очного яблука і сітківки, гістологічні – для оцінки змін структурних елементів сітківки, молекулярно-біологічні – для визначення експресії генів факторів-активаторів та інгібіторів неангіогенезу, статистичний аналіз – для оцінки достовірності одержаних результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримано альтернативну існуючій моделі ретинопатії, що викликана впливом оксисену, експериментальну модель ретинопатії з неоангіогенезом.

Вперше досліджено експресію генів про- і антиангіогенних факторів на модельній патології сітківки ока. В патологічно зміненій сітківці домінує експресія гену VEGF над PEDF.

Вивчено, що в динаміці патологічного процесу зберігається переважання VEGF над PEDF. На фоні лікування кріоконсервованими ядровмісними клітинами кордової крові людини відбувається стрімке збільшення експресії гену PEDF і його домінування над експресією гену VEGF.

Доповнено наукові дані щодо особливостей зворотнього розвитку новоутворених судин у задньому відділі ока експериментальних тварин: запусілі новоутворені судини формують конгломерати в порожнині склистого тіла.

Отримані результати доповнюють дані щодо механізмів дії кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини, розширюють знання про процеси репараційної регенерації при ретинопатії з неоангіогенезом на тлі використання препарату кріоконсервованої кордової крові.

На основі отриманих експериментальних даних досліджено основні механізми дії кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини.

Вперше сформульовано етіопатогенетичне обґрунтування застосування кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові для лікування ретинопатії з неоангіогенезом.

Практичне значення. Розроблена модель ретинопатії з неоангіогенезом, яка полягає у інтраперитонеальному введенні 1%-го розчину бринзоламідю новонародженим щурам (Патент України на корисну модель 84441 № u 201303666) (Дьомін Ю.А., Білецька П.В., 2013), дозволяє вивчити на всіх стадіях процес утворення патологічних судин у задньому відділі ока. Винахід (корисна модель) використовується в лекційних курсах кафедри офтальмології Харківської медичної академії післядипломної освіти при викладенні матеріалу щодо діагностики та лікування патології сітківки.

На основі отриманих експериментальних даних створено новий алгоритм лікування ретинопатії з неоангіогенезом. Розроблений алгоритм передбачає однократне інтравітреальне введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини.

Даний алгоритм може бути запропонований для клінічного використання з метою лікування проліферативної діабетичної ретинопатії, ексудативної форми вікової макулярної дегенерації, неоваскулярної епіретинальної мембрани та ретинопатії недоношених.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено

патентно-інформаційний пошук, аналіз літературних даних. Разом із науковим керівником професором Дьомінім Ю.А. визначена тема дисертації, сформульована мета, визначені задачі дослідження та обрані методи їх вирішення. В результаті самостійного вивчення літератури та аналізу клінічних даних автор теоретично обґрунтувала необхідність і шляхи удосконалення лікування ретинопатії з неангіогенезом.

Морфологічні дослідження очей експериментальних тварин проводились самостійно на базі віварію і лабораторій ІПКіК НАН України за участі д. м. н., професора Дьоміна Ю.А., ст. н. с. Шарлай Т.М., зав. віварієм Бацунової Л.В.

Молекулярно-біологічні дослідження експресії генів про- і антиангіогенних факторів виконані в лабораторії Банку пуповинної крові, інших тканин і клітин людини (м. Київ) за участю і консультативною допомогою к. б. н. Шаблія В.А.

У співавторстві з д. м. н., професором Дьомінім Ю.А. розроблено експериментальну модель ретинопатії з неангіогенезом. Автором особисто на всіх етапах роботи проведено всі маніпуляції експериментальним тваринам. Дисертанткою створено базу даних, на підставі якої проведено аналіз і статистичну обробку матеріалу. Висновки сформульовано разом із науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи доповідалися на конференції молодих вчених «International congress of medical science for students and young doctors» (Софія, Болгарія, 2013); «24th European Students Conference» (Берлін, Німеччина, 2013); «3rd Congress of Croatian physiological society and 1st Regional congress of the physiological societies» (Загреб, Хорватія, 2013); Всеукраїнській науково-практичній конференції офтальмологів із міжнародною участю «Азаровські читання. Нейроофтальмологія. Патологія сітківки» (Судак, Україна, 2013); «18th Winter meeting European society of cataract & refractive surgeons» (Любляна, Словенія, 2014); Міжнародній заочній науково-практичній конференції «Теоретичні і практичні аспекти сучасної кріобіології» (Сиктивкар, Росія, 2014); XIII з'їзді офтальмологів України «Філатовські читання» (Одеса, Україна, 2014); конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині» (Харків, Україна, 2014); International student congress of (bio)medical sciences ISCOMS'15 (Гронінген, Нідерланди, 2015); Конгресі німецького офтальмологічного товариства DOG'15 (Берлін, Німеччина, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць, з них – 6 статей у наукових фахових журналах, 5 робіт – у матеріалах з'їздів, науково-практичних конференцій, у тому числі 6 закордонних, отримано 2 патенти України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 140 сторінках друкованого комп'ютерного тексту, з яких 110 – основний текст. Складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів

дослідження, двох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних літературних джерел, який містить 270 найменувань і займає 30 сторінок. Робота містить 31 рисунок та 13 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Морфологічні дослідження очей експериментальних тварин виконані в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за регламентом, затвердженим Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України, який було розроблено відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом з біоетики (Київ, 2013) і узгоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Моделювання ретинопатії з неоангіогенезом проводилося на новонароджених щурах лінії Вістар із чотирьох пометів. Тварин залежно від проведених маніпуляцій розподілили на групи:

- група 1 (n=18) – інтраперитонеальне введення 0,1 мл 1%-го розчину бринзоламід (200 мг/кг маси тіла) двічі на добу;
- група 2 (n=13) – інтраперитонеальне введення 0,1 мл 0,9%-го розчину NaCl двічі на добу.

Ін'єкції виконувалися з 2-ї по 7-у добу життя лабораторних тварин. З 8-ї по 12-у добу ін'єкції не проводилися. На 13-у добу постнатального розвитку стан очей тварин оцінювався за допомогою офтальмоскопа. У всіх тварин, які отримували бринзоламід, було виявлено змутнення кришталика, тому оцінити стан сітчастої оболонки на живому оці було неможливо. На 13-у добу постнатального розвитку щурів із всіх пометів піддавали евтаназії.

Тварин (n=30), які були відібрані для подальших досліджень, розподілили на три дослідні групи:

- група 3 (n=10, 20 очей) – щури з ретинопатією, яким інтравітреально вводили кЯКККЛ в об'ємі 0,005 мл (100 тис. клітин);
- група 4 (n=10, 20 очей) – щури з модельованою патологією, які не отримували лікування;
- група 5 (n=10, 20 очей) – інтактні тварини.

Для експериментального лікування використовували препарат кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини. Кількість ядровмісних клітин у 1 мл препарату становила 20×10^6 , кількість життєздатних $CD34^+CD45^{dim}$ -клітин – 0,6%. Препарат отриманий із Банку пуповинної крові, інших тканин і клітин людини (м. Київ). Кордову кров отримували класичним методом при фізіологічних пологах або операції кесаревого розтину на 39–41-й тиждень вагітності у пацієнток віком 23–36 років на підставі їх інформованої згоди.

З урахуванням малого розміру очного яблука експериментальних

тварин для інтравітреального введення кЯКККЛ була використана голка діаметром 200 мкм, з'єднана зі шприцем 0,01 мл («Hamilton», Швейцарія).

Біологічний матеріал (тканини очного яблука) отримували після енуклеації на 45-у добу постнатального розвитку тварин.

Проведено аналіз гістологічних препаратів очних яблук (6 із кожної групи) та експресії генів про- і антиангіогенних факторів у сітківці експериментальних щурів (14 очей із кожної групи) за допомогою ПЛР у реальному часі. Для отримання відносних рівнів експресії генів VEGF і PEDF проводили біоінформативний аналіз отриманих даних із використанням порівняльного ΔCT методу, у якому рівень експресії гена (X) = $2^{-\Delta\text{CT}}$, (ΔCT = (СТ ген інтересу – СТ контрольний ген), або методу порівняння $\Delta\Delta\text{CT}$, у якому рівень експресії гена (X) = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, ($\Delta\Delta\text{CT}$ = (група НОРМА (СТ ген інтересу – СТ контрольний ген) і група ПАТОЛОГІЯ (СТ ген інтересу – СТ контрольний ген)).

Для оцінки отриманих результатів застосовували методи статистичного аналізу і програму «STATISTICA. 10.0» («StatSoft Inc.», США). Для характеристики центральної тенденції параметричних даних використовували середнє арифметичне (Mean), для характеристики розподілення ознаки – стандартне відхилення (SD), для перевірки гіпотез – параметричний t-критерій Стьюдента та непараметричний критерій Манна-Уїтні.

Результати власних досліджень та їх аналіз.

Особливості експресії генів VEGF і PEDF У експериментальній моделі ретинопатії з неоангіогенезом. Результати дослідження ПЛР сітківки показали, що в групі тварин з інтраперитонеальним введенням 0,9%-го розчину NaCl, експресія генів як VEGF так і PEDF була на низькому рівні. У групі тварин, які інтраперитонеально отримували 1%-й розчин бринзоламідуспостерігалосся стрімке збільшення експресії гена VEGF, що в 45 разів перевищувало аналогічний показник у групі 2 (рис. 1).

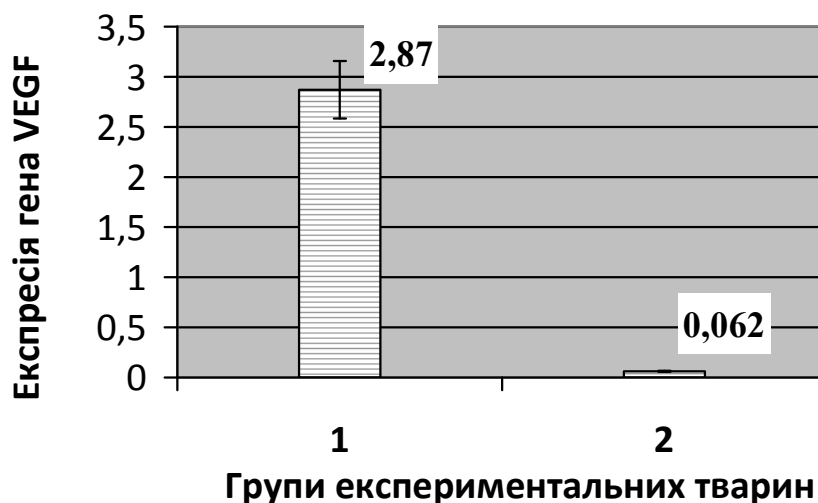


Рис. 1. Середнє значення експресії гена VEGF у тварин груп 1 та 2. Різниця між показниками значуща ($p < 0,05$) згідно з критерієм Стьюдента.

Виявилось, що в групі 1 рівень експресії гена PEDF перевищував в 1,5 рази цей показник групи 2 (рис. 2).

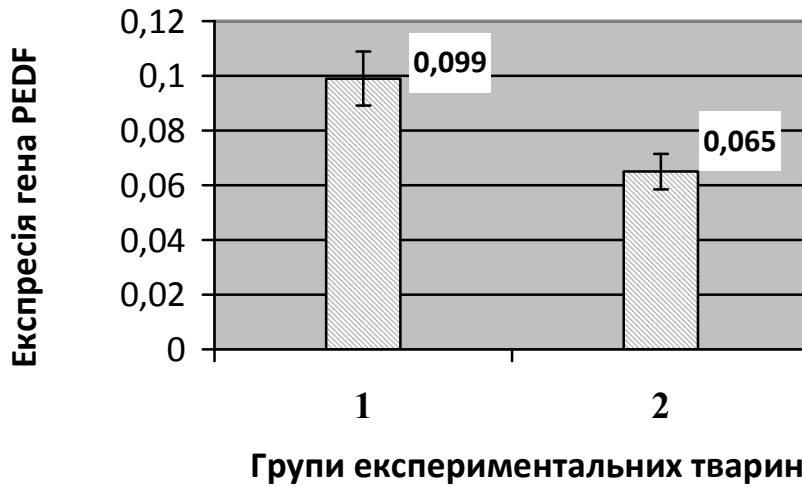


Рис. 2. Середнє значення експресії гена PEDF у тварин груп 1 та 2. Різниця між показниками значуща ($p < 0,05$) згідно з критерієм Манна-Уїтні.

У групі 2 співвідношення генів VEGF/PEDF приблизно дорівнювало 1,0 ум. од., а в групі 1 – 29,07 ум. од. (рис. 3).

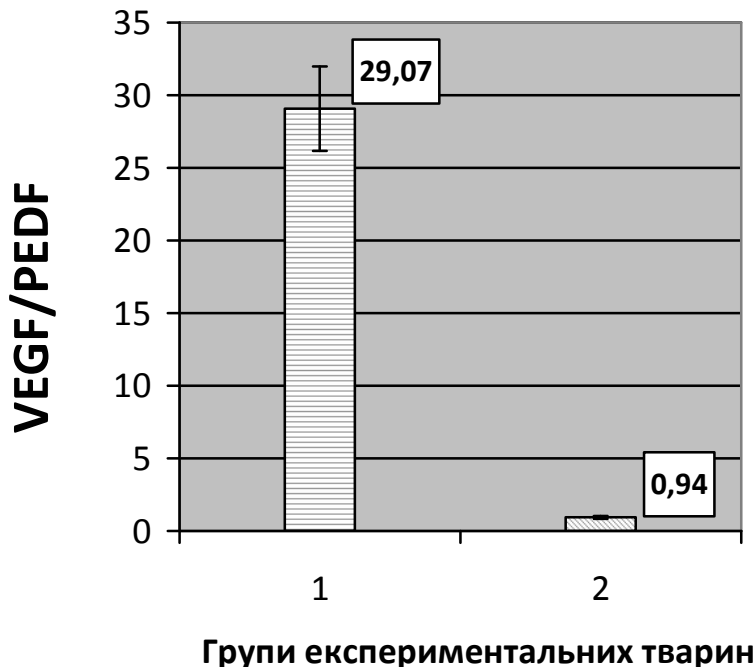


Рис. 3. Середнє значення співвідношення генів VEGF та PEDF у 1 та 2 групах тварин. Різниця між показниками значуща ($p < 0,05$) згідно з критерієм Стьюдента.

Отже, в сітківці ока щурів виявлені такий рівень експресії та співвідношення генів як про-, так і антиангіогенного факторів, при яких в

організмі чітко контролюється нормальний розвиток судин. На тлі інтраперитонеального введення новонародженим щурам 1%-го розчину бринзоламідю і подальшого метаболічного ацидозу відбувається стимуляція експресії генів ангиогенного фактора, що призводить до появи новоутворених судин у сітківці ока.

Динаміка молекулярно-біологічних змін експресії генів VEGF і PEDF у експерименті. Результати ПЛР у реальному часі показали, що в групі інтактних тварин на 45-у добу постнатального розвитку зберігаються однаково низькі рівні експресії генів як про-, так й антиангіогенних факторів.

У групі 4 спостерігалось збільшення експресії генів VEGF і PEDF до 1,933 та 1,165 ум.од. відповідно. Важливо, що в усіх зразках тканини сітківки рівень VEGF у групі 4 статистично значуще перевищував рівень PEDF. До того ж співвідношення цих факторів було близьким до 2,0 ум. од., що свідчить про прогресування процесу неоангіогенезу. Слід відзначити, що в динаміці патологічного процесу неоангіогенезу виявилось стрімке зростання експресії гена проангіогенного фактора на 13-у добу (з 0,062 до 2,87 ум. од.) (див. рис. 1) та деяке його зниження (з 2,87 до 1,935 ум. од.) на 45-у добу постнатального розвитку лабораторних тварин (рис. 4).

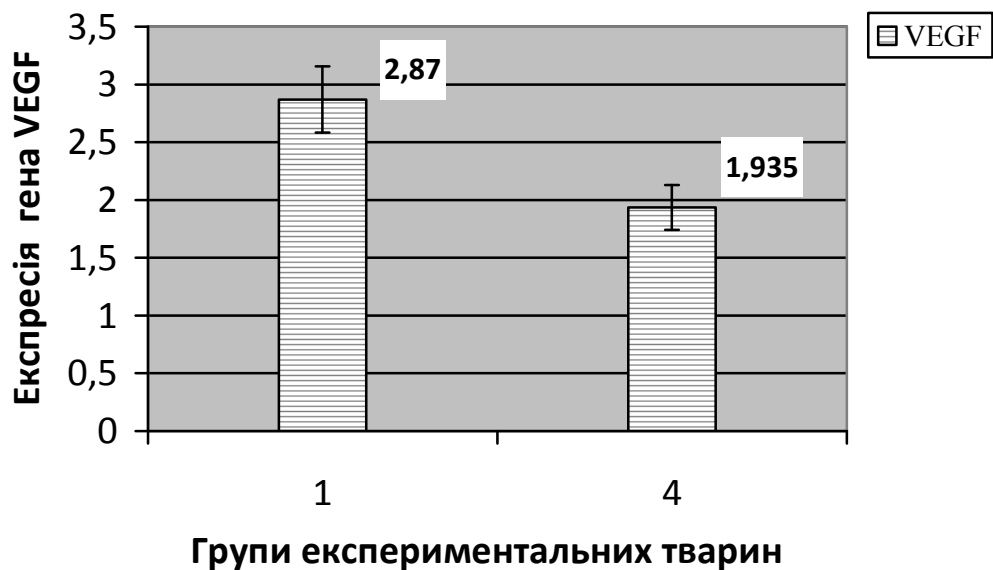


Рис. 4. Середні значення експресії гена VEGF у тварин груп 1 та 4. Різниця між показниками значуща ($p < 0,05$) згідно з критерієм Стьюдента.

Отже, можна констатувати, що пік експресії гена VEGF відбувається на момент формування новоутворених судин у сітківці очей тварин із модельованою ретинопатією.

За даними ПЛР у реальному часі виявилися зміни в експресії гена

PEDF у динаміці розвитку ретинопатії з неангіогенезом. Так, на 13-у добу постнатального розвитку експериментальних щурів (група 1) середнє значення антиангіогенного фактора становило 0,099 ум. од., а на 45-у добу (група 4) – 1,165 ум. од. Однак рівень експресії гена VEGF домінував над аналогічним показником PEDF у групах 1 та 4. Отже, за умов навіть невеликої переваги проангіогенного фактора над антиангіогенним процес неангіогенезу прогресує (рис. 5).

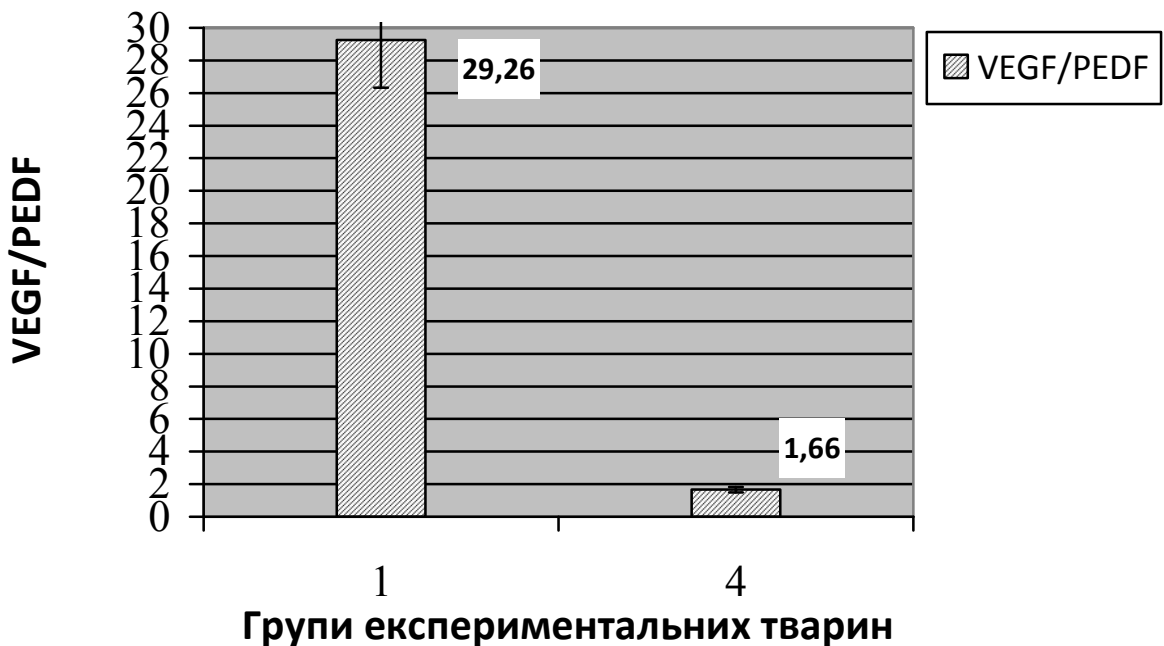


Рис. 5. Середнє значення співвідношення генів VEGF/PEDF у 1 та 4 групах тварин. Різниця між показниками значуща ($p < 0,05$) згідно з критерієм Стьюдента.

За даними ПЛР у групі 3 на тлі інтравітреального введення кЯКККЛ встановлено значуще збільшення експресії гена PEDF у порівнянні з групою 5 (з 0,071 до 1,875 ум. од.) та групами 1 і 4 групами (з 0,099 та 1,165 до 1,875 ум.од. відповідно). В усіх зразках тканини сітківки ока щурів, яких лікували кЯКККЛ, було виявлено значну перевагу показника PEDF над VEGF. Також у групі 3 відбулося стрімке зниження експресії гена VEGF порівняно з групами 1 і 4 з 2,87 та 1,935 до 0,199 ум. од. відповідно. Слід відзначити, що пригнічення ангіогенезу за лабораторними даними спостерігалось тільки в групі 3, тобто у тварин, яких лікували кЯКККЛ (рис. 6).

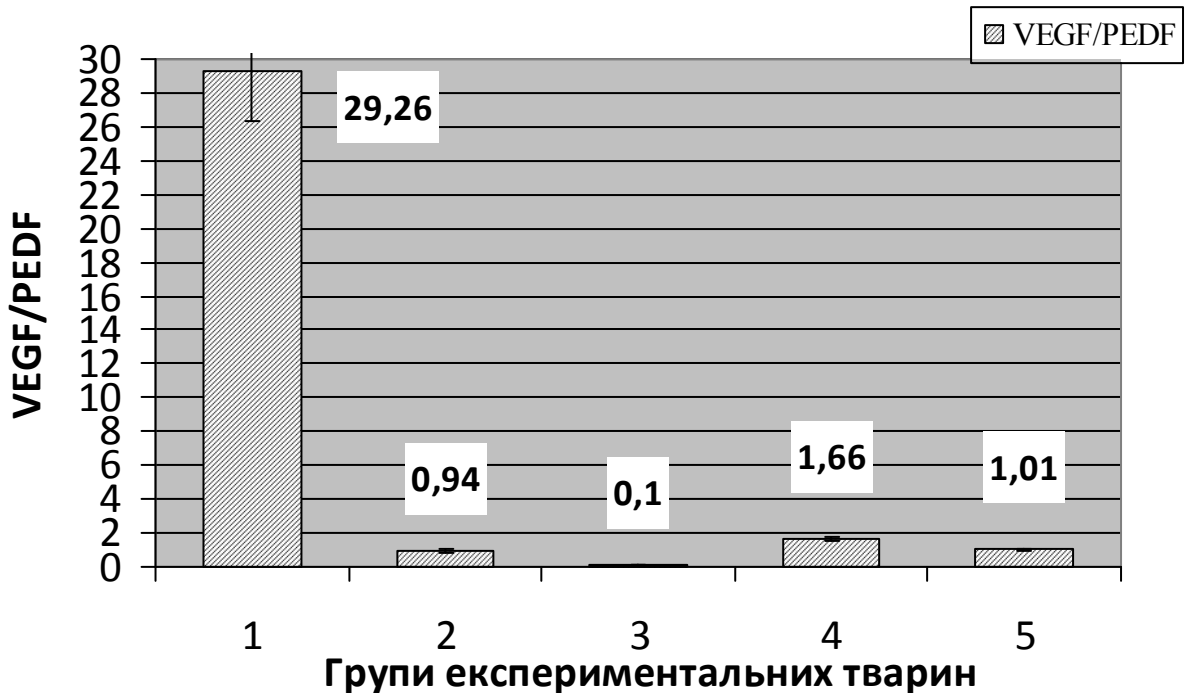


Рис. 6. Середнє значення співвідношення генів VEGF/PEDF в усіх групах тварин. Різниця між показниками значуща ($p < 0,05$) згідно з критерієм Стьюдента та Манна-Уїтні.

Гістологічна картина сітківки ока тварин в експериментальній моделі ретинопатії з неангіогенезом. Сітчаста оболонка ока тварин групи 2 представлена десятьма чітко вираженими шарами, які мають різну товщину в центральній та периферійній її частинах ($(204 \pm 2,16)$ і $(154,06 \pm 1,61)$ мкм відповідно). Зовнішні сегменти фоторецепторів короткі, більшість із них має фрагментарний вигляд. Товщина внутрішнього плексиформного шару (ВПШ) складала $(42 \pm 2,19)$ мкм; зовнішнього плексиформного шару (ЗПШ) – $(18 \pm 1,63)$ мкм; внутрішнього ядерного шару (ВЯШ) – $(40,94 \pm 1,77)$ мкм; зовнішнього ядерного шару (ЗЯШ) – $(55 \pm 1,89)$ мкм; шару гангліонарних клітин (ШГК) – $(23,06 \pm 1,76)$ мкм. Поверхня внутрішньої лімітуючої мембрани (ВЛМ) у центральних і периферійних відділах тонка, але добре виражена.

Формування щільної білатеральної катаракти у тварин з групи 1 стало побічним ефектом введення брінзоламідру. Це завадило вивченню стану сітчастої оболонки за допомогою офтальмоскопічних методів.

При дослідженні гістологічних препаратів були виявлені істотні патоморфологічні зміни речовини кришталика: набряк і набухання його капсули, проліферація епітеліальних клітин, вакуолізація гіалінового шару, а також роз'єднання і колапс кришталикових волокон.

В очних яблуках тварин групи 1 після інтраперитонеального введення бринзоламідю виявлялося стоншення сітківки на 19,73% в порівнянні з інтактною групою (табл. 1).

Таблиця 1

Морфометричні зміни сітчастої оболонки ока тварин груп 1 та 2 (мкм)

Відділи сітківки	Група 2		Група 1	
	Mean	±SD	Mean	±SD
Центральний відділ	204	2,16	163,77*	1,8
Периферичний відділ	154,06	1,61	122,5*	1,33
ВПШ	42	2,19	39,66*	2,49
ЗПШ	18	1,63	14,77*	1,8
ВЯШ	40,94	1,77	28*	1,53
ЗЯШ	55	1,89	35*	2,05
ШГК	23,06	1,76	19*	2,05

Примітка: * – дані значуще ($p < 0,05$) відрізняються від таких у групі 2 відповідно до критерію Стьюдента.

На сітківці ока тварин, яку порушували структуру ВЛМ, були виявлені вузли новоутворених судин (рис. 7).

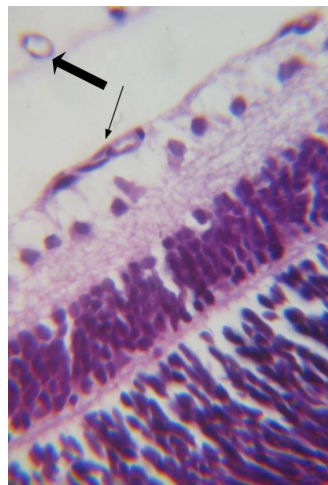


Рис. 7. Ділянка сітчастої оболонки ока щура групи 1. Зabarвлення гематоксиліном і еозином, $\times 1000$. Стрілками позначено тонкостінні новоутворені судини на поверхні ВЛМ (тонка стрілка) і в товщі відшарованої задньої гіалоїдної мембрани (товста стрілка).

Таким чином, на даному етапі експерименту доведено, що у новонароджених щурів на тлі інтраперитонеального введення бринзоламідю виникає ретинопатія з неоваскулягенезом. Поява преретинальних вузлів неоваскуляризації на 13-у добу постнатального розвитку експериментальних тварин співпадає з піком експресії генів проангіогенного фактора.

Патоморфологічні зміни сітківки очей експериментальних тварин усіх груп. У групі 5 патоморфологічних змін на сітківці виявлено не було. Її архітектоніка не була порушеною, зберігалось співвідношення шарів. У групі 3 на тлі інтравітреального введення кЯКККЛ в товщі склистого тіла виявлено конгломерати запустілих новоутворених судин. Внутрішня лімітуюча мембрана була інтактною, тракційних зрощень не виявлено (рис. 8).

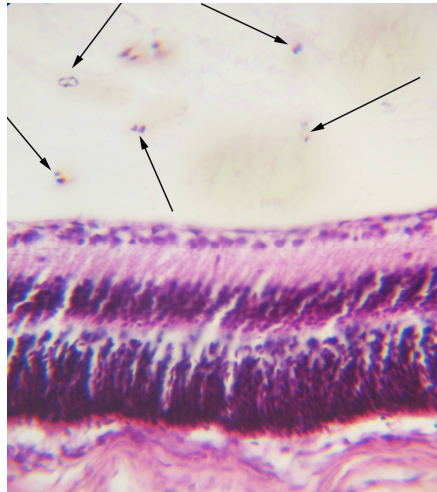


Рис. 8. Ділянка сітчастої оболонки ока щура групи 3. Забарвлення гематоксиліном і еозином, х400. Конгломерат запустілих новоутворених судин із ядрами ендотеліоцитів позначено стрілками.

Крім того, у тварин групи 3 було відзначено збільшення товщини сітчастої оболонки в порівнянні з групою 4 (табл. 1). Важливо, що найбільші зміни в сітчастій оболонці очей тварин, які отримували лікування кЯКККЛ, були виявлені у внутрішньому ядерному шарі, в якому, як відомо, розташовані горизонтальні, біполярні клітини, а також велика кількість клітин Мюллера.

Відомо, що саме в цьому шарі сітківки відбуваються секрція і виділення клітинами Мюллера PEDF та інших антиангіогенних факторів. Доведено, що клітини Мюллера мають високу метаболічну активність, вони постачають нейронам сітчастої оболонки продукти розпаду глікогену, необхідного для аеробного метаболізму. Крім того, клітини Мюллера здійснюють виведення продуктів обміну нейронів (вуглекислого газу, аміаку, продуктів обміну амінокислот), і захист нейронів від надмірного

вивільнення нейромедіаторів. Важливо вказати, що клітини Мюллера синтезують ретиноїдну кислоту з ретинолу, що важливе для розвитку сітчастої оболонки ока, центральної нервової системи, а також метаболізму зорового пігменту (Віт В. В., 2003).

Таблиця 2

Морфометричні зміни у сітчастій оболонці ока експериментальних тварин груп 3 та 4 (мкм)

Відділи сітківки	Група 3		Група 4	
	Mean	±SD	Mean	±SD
Центральний відділ	180*	1,41	165	0,63
Периферичний відділ	139,8*	2,0	125	1,41
ВПШ	29,2*	0,75	23,2	0,98
ЗПШ	7*	0,9	5	0,63
ВЯШ	24*	1,55	17,8	0,75
ЗЯШ	40,5*	1,38	31,8	1,17
ШГК	19*	1,1	15	1,41

Примітка: * – дані значуще ($p < 0,05$) відрізняються від таких у групі 4 відповідно до критерію Стьюдента.

У групі 4 за результатами гістологічного аналізу виявлено прогресування преретинальної неоваскуляризації: розповсюдження новоутворених судин на задню гіалоїдну мембрану, в товщу склистого тіла і на задню капсулу кришталика. Також з'явилося більше ділянок проліферації, епіретинальні зрощення і формування тракцій на сітківці (рис. 9).

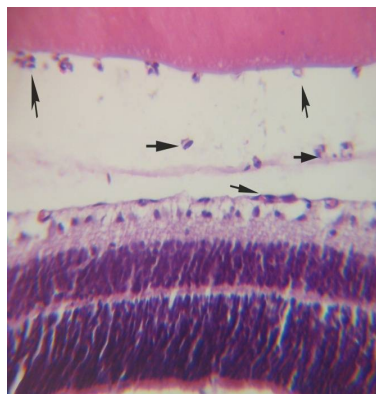


Рис. 9. Ділянка сітчастої оболонки ока щура групи 4. Забарвлення гематоксиліном і еозином, x100. Стрілками позначено вузлики неоваскуляризації.

Отже, отримані морфологічні дані співпадають із результатами молекулярно-біологічного дослідження. На нашу думку, цим процесам сприяє інтеграція введених кЯКККЛ.

У даній роботі не було встановлено, чи відбулося диференціювання введених кЯКККЛ. Однак зміна співвідношень генів про- і антиангіогенних факторів та нормалізація архітекtonіки сітчастої оболонки ока у щурів групи 3 свідчать про функціональну активність введеного біологічного матеріалу.

Отже, терапевтичний ефект клітин кріоконсервованої кордової крові заснований на збереженні життєздатності та функціональної активності кЯКККЛ після відігрівання, а також на виробленні найширшого спектра збалансованих біологічно активних речовин, які здійснюють свою дію в умовах неоангіогенезу. Завдяки цьому введені інтравітреально кЯКККЛ коригують функціональний статус системи гомеостазу сітчастої оболонки ока. Перевага введення кЯКККЛ в порівнянні з іншими фармакологічними агентами полягає в тому, що біологічний матеріал реалізує свою дію не тільки після введення, а й протягом усього терміну життя клітин.

Крім того, на підставі отриманих результатів патоморфологічного дослідження можна припустити, що кЯКККЛ можуть бути будівельним матеріалом, забезпечувати оновлення структур пошкодженої сітчастої оболонки ока, а саме її внутрішнього ядерного шару.

Тому основними механізмами дії кЯКККЛ є нейротрофічний вплив, модуляція і корекція процесів неоангіогенезу та його інгібування. Все це дозволяє вважати, що введені кЯКККЛ активно впливають на відновлення балансу про- і антиангіогенних факторів.

Таким чином, на підставі результатів проведеного дослідження, встановлено, що препарат кЯКККЛ може застосовуватися для лікування різних форм ретинопатії з неоангіогенезом, дозволяє запобігати прогресуванню патологічного процесу, а також мінімізувати ризик незворотнього зниження зору та інвалідизації пацієнтів.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведені теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової проблеми ефективного методу лікування ретинопатії із неоангіогенезом. У роботі представлено теоретичне і практичне обґрунтування інтравітреального застосування кріоконсервованих ядромісних клітин кордової крові та доведено ефективність їх використання на експериментальній моделі ретинопатії з неоангіогенезом.

1. Визначено патогенетичні механізми неоангіогенезу, на підставі чого створено нову авторську експериментальну модель ретинопатії з неоангіогенезом, яка була індукована інтраперитонеальним введенням 1%-го розчину бринзоламиду в дозі 200 мг/кг маси тіла тварин двічі на добу з 2-ї по 7-у добу постнатального розвитку.

2. Встановлено, що сітчаста оболонка в нормі продукує певний рівень генів про- та антиангіогенних факторів у такому співвідношенні, що зберігається баланс між активаторами та інгібіторами неоангіогенезу. У патологічно зміненій сітчастій оболонці ока експресія гена VEGF домінує в 29 разів. Виявлено, що на 13-у добу постнатального розвитку тварин на тлі інтраперитонеального введення 1%-го розчину бринзоламід у тканині сітчастої оболонки підвищується експресія генів як про-, так й антиангіогенних факторів, з явним переважанням VEGF, що свідчить про розвиток процесу неоангіогенезу.

3. У групі тварин із модельованою патологією при патоморфологічному дослідженні на сітчастій оболонці ока виявлені вузли неоваскуляризації. Була встановлена структурна особливість новоутворених судин: тонка стінка з поодинокими ендотеліоцитами і формування вузлів із ендотеліоцитів на початкових етапах формування нових судин. Побічною дією введення 1%-го розчину бринзоламід було формування щільної двосторонньої катаракти.

4. Експериментально доведено, що інтравітреальне введення є ефективним методом постачання кЯКККЛ до тканини сітківки при лікуванні ретинопатії з неоангіогенезом.

5. Встановлено, що після одноразової інтравітреальної ін'єкції кЯКККЛ, відбулося блокування процесу неоангіогенезу. Спостерігалось більше ніж 10-кратне зниження рівня експресії гена VEGF та 2-кратне збільшення рівня експресії гена PEDF у порівнянні з тваринами груп 1 та 4, які не отримували лікування. У динаміці патологічного процесу ретинопатії з неоангіогенезом виявлено високий рівень експресії генів VEGF та PEDF зі значною перевагою гена проангіогенного фактора, що означає збереження проліферативних процесів у сітчастій оболонці ока експериментальних тварин, які не отримували лікування.

6. На основі даних морфологічного дослідження сітчастої оболонки очей експериментальних тварин встановлено, що процес неоангіогенезу супроводжується стоншенням сітківки. Застосування кЯКККЛ нормалізує архітектоніку сітчастої оболонки ока.

7. Визначено, що інтравітреальне введення кЯКККЛ дозволяє оптимізувати баланс про- та антиангіогенних факторів у патологічно зміненій сітчастій оболонці ока, сприяє регресу новоутворених судин, позитивно впливає на відновлення гомеостазу сітчастої оболонки.

8. Показана ефективність використання кЯКККЛ при ретинопатії з неоангіогенезом в умовах експерименту, що може бути основою для розробки нового методу лікування захворювань цієї групи.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Демин Ю.А. Бринзоламид-индуцированная ретинопатия у новорожденных крыс: альтернативная животная модель неоваскулярной патологии сетчатки / Ю.А. Демин, П.В. Белецкая, И.Д. Гапунин //

Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – №3, Ч. 2 (63). – С. 49–51.

2. Дёмин Ю.А. Патогенетические аспекты неоваскулярной патологии сетчатки / Ю.А. Дёмин, П.В. Белецкая // Архив украинской офтальмологии. – Т.1, №1. – 2013. – С. 39–45.

3. Дёмин Ю.А. Применение ядродержащих клеток кордовой крови при неоваскулярной ретинопатии у экспериментальных животных / Ю.А. Дёмин, П.В. Белецкая // Офтальмология. Восточная Европа. – 2014. – №2 (21). – С.108–117.

4. Dyomin Yu. A. Cord blood derived nuclear cells usage in animal model of neovascular retinopathy / Yu. A. Dyomin, P. V. Biletska // Buk. Med. Herald. – 2014. – Vol. 18, №3 (71). – P. 68–73.

5. Dyomin Y. A. Bronzamide-induced retinopathy in neonatal rat: an alternative animal model of retinal neovascularization / Y. A. Dyomin, P. V. Biletska, I. D. Gapunin // Periodicum Biologorum. – 2014. – Vol. 116, №1. – P. 95–99.

6. Белецкая П. В. Динамика экспрессии генов про- и антиангиогенного факторов на фоне применения ядродержащих клеток кордовой крови в экспериментальной модели неоваскулярной ретинопатии / П. В. Белецкая, Ю. А. Дёмин // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 2, №24. – С. 166.

7. Пат. 84441, Україна, МПК G 09В 23/28. Спосіб моделювання неоваскулярної патології сітківки / Дьомін Ю.А., Білецька П.В.; власник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – № u 201303666; заявл. 26.03.2013; опубл. 25.10.2013, Бюл. №20.

8. Пат. 91081, Україна, МПК G 09В 23/28. Спосіб моделювання катаракти / Дьомін Ю. А., Білецька П. В.; власник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – № u 201313991; заявл. 02.12.2013; опубл. 25.06.2014, Бюл. №12.

9. Biletska P. Metabolic acidosis induces cataract in neonatal rats / P. Biletska, Yu. Dyomin, I. Gapunin // ESCRS [serial online]. Available from: URL:// <http://www.es CRS.org/ljubljana2014/programme/posters-details.asp?id=20020>.

10. Дёмин Ю. А. Применение стволовых клеток криоконсервированной кордовой крови в лечении ретинопатии с неоангиогенезом у экспериментальных животных / Ю. А. Дёмин, П.В. Белецкая, И. Д. Гапунин // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии: Материалы международ. науч.-практ. конф. (Россия–Украина). – Сыктывкар, 2014. – С. 104–109.

11. Biletska P.V. The rat model of acidosis-induced retinopathy: a suitable animal model for angiogenesis research / P. V. Biletska, I. D. Gapunin // 24'th European students conference. Abstract book. – 2013. – P. 280.

12. Дёмин Ю. А. Применение ядросодержащих клеток кордовой крови при неоваскулярной ретинопатии у экспериментальных животных / Ю. А. Дёмин, П. В. Белецкая // Материалы науч.-практ. конф. – Одесса, 2014. – С. 148.

13. Biletska P. Intravitreal transplantation of cryopreserved cord blood derived nuclear cells in neovascular retinopathy animal model / P. Biletska, I. Gapunin // 113 DOG-Kongress. Ophthalmology – basic research and cross-disciplinary cooperation. Programm. – 2015. – P.145.

АНОТАЦІЯ

Білецька П. В. Ядровмісні клітини кордової крові в лікуванні експериментальної ретинопатії з неоангіогенезом. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина. Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків, 2015.

Дисертаційна робота присвячена вивченню механізмів дії кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини та їх впливу на структурно-функціональну характеристику сітківки ока експериментальних тварин із модельованою ретинопатією з неоангіогенезом.

У роботі використана запропонована автором експериментальна модель ретинопатії з неоангіогенезом.

За даними ПЛР у реальному часі показано, що сітчаста оболонка ока за нормальних умов продукує певний рівень генів про- і антиангіогенних факторів у співвідношенні, при якому зберігається баланс між активаторами та інгібіторами ангіогенезу. В патологічно зміненій сітківці домінує експресія гена VEGF, яка запускає каскад неоангіогенезу та викликає появу і розповсюдження новоутворених судин на сітківці.

Експериментально доведено, що на тлі інтравітреального введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові щурам із модельованою патологією новоутворені судини зазнають зворотнього розвитку. Це підтверджено морфологічними даними та результатами ПЛР у реальному часі.

Ключові слова: ретинопатія, неоваскуляризація, кріоконсервована кордова кров, ядровмісні клітини, ангіогенез.

АННОТАЦИЯ

Белецкая П. В. Ядросодержащие клетки кордовой крови в лечении экспериментальной ретинопатии с неоангиогенезом. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.35 – кріомедицина. Институт проблем кріобиологии и кріомедицины НАН Украины, Харьков, 2015.

Диссертационная работа посвящена изучению механизмов действия криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови и их влиянию на структурно-функциональную характеристику сетчатой оболочки экспериментальных животных с моделированной ретинопатией с неоангиогенезом.

В работе использована предложенная автором экспериментальная модель ретинопатии с неоангиогенезом. Интраперитонеальное введение бринзоламида новорожденным крысам в дозе 200 мг/кг дважды в сутки явилось причиной ишемии сетчатой оболочки и дальнейшей активизации процессов неоангиогенеза.

По данным ПЦР в реальном времени показано, что сетчатая оболочка в норме продуцирует определенный уровень генов про- и антиангиогенных факторов. При таком количестве этих факторов поддерживается нормальное развитие и функционирование сетчатой оболочки глаза.

Установлено, что в патологически измененной сетчатке преобладает экспрессия гена VEGF, при которой запускается каскад неоангиогенеза, появляются и распространяются новообразованные сосуды в сетчатке. В ответ на повышение экспрессии гена VEGF в динамике процесса неоангиогенеза увеличивается экспрессия гена PEDF. Однако количества последнего недостаточно для контроля новообразования сосудов и блокирования пролиферативных процессов.

Морфологические исследования показали, что интраперитонеальное введение 1%-го раствора бринзоламида вызывает пролиферативную активность эндотелиоцитов, которая достигает необходимого пика интенсивности уже к 13-м суткам постнатального развития животных, сопровождается активным прорастанием новообразованных сосудов на внутреннюю поверхность сетчатой оболочки.

Формирование плотной билатеральной катаракты стало побочным эффектом введения бринзоламида. Этот факт не позволил изучить состояние сетчатой оболочки офтальмоскопически. При исследовании гистологических препаратов были обнаружены существенные патоморфологические изменения вещества хрусталика: отек и набухание его капсулы, пролиферация эпителиальных клеток, вакуолизация гиалинового слоя, а также разобщение и коллапс хрусталиковых волокон.

В динамике патологического процесса эпиретинальная мембрана формирует тракционные сращения с сетчатой оболочкой.

Экспериментально доказано, что на фоне интравитреального введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови крысам с моделированной патологией новообразованные сосуды подверглись обратному развитию.

Морфологически выявлено, что в группе животных, получивших лечение кЯКККЧ, новообразованные сосуды находились на этапе обратного развития, формируя конгломерат мембранных структур с

единичными ядрами эндотелиоцитов. Новообразование сосудов не сопровождалось появлением волокнистой ткани и формированием эпиретинальной мембраны.

Данные ПЦР в реальном времени показали, что после однократной интравитреальной инъекции препарата кЯКККЧ в дозе 0,005 мл (100 000 клеток) увеличилась экспрессия гена антиангиогенного фактора, а также снизилась экспрессия проангиогенного фактора по отношению к группам с моделированной патологией и естественным течением ретинопатии. Кроме того, 10-кратное преобладание экспрессии гена PEDF над VEGF у животных, получивших лечение, свидетельствует о подавлении активности процесса неоангиогенеза в сетчатой оболочке экспериментальных животных.

Ключевые слова: ретинопатия, неоваскуляризация, криоконсервированная кордовая кровь, ядродержащие клетки, ангиогенез.

ANNOTATION

Biletska P.V. Cord blood derived nuclear cells usage in experimental neovascular retinopathy treatment. – Manuscript.

Thesis for a candidate's degree by speciality 14.01.35 – cryomedicine. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Science of Ukraine, Kharkiv, 2015.

Thesis is devoted to the study of cryopreserved cord blood derived nuclear cells action mechanisms to optimize the treatment neoangiogenesis retinopathy.

Real-time PCR data showed that normal retina produces a certain level of pro- and antiangiogenic factors genes in a ratio that remains a balance between angiogenesis activators and inhibitors.

In the neovascular retinopathy prevails VEGF gene expression, which triggers a neoangiogenesis cascade and causes the emergence and spread of newly formed blood vessels in the retina.

Experimentally proved that intravitreal injection of cryopreserved cord blood derived nuclear cells in rats with a neovascular retinopathy, newly formed vessels have undergone reverse development. This was confirmed morphologically and using real-time PCR.

Key words: retinopathy, neovascularisation, cryopreserved cord blood, nuclear cells, angiogenesis.

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ:

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) – фактор росту ендотелію судин
PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor) – фактор росту пігментного епітелію

ЯДК КК – ядровмісні клітини кордової крові

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ВЛМ – внутрішня лімітуючи мембрана

ВПШ – внутрішній плексиформний шар

ЗПШ – зовнішній плексиформний шар

ВЯШ – внутрішній ядерний шар

ЗЯШ – зовнішній ядерний шар

ШГК – шар гангліонарних клітин