

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

ДЬОМІНА МАРІЯ ЮРІЇВНА

УДК: 611.018.2/.6:615.014.41:617.735-002

**ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ
СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ ПРИ ЛІКУВАННІ
ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ**
(експериментальне дослідження)

14.01.35. – Кріомедицина

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків – 2016

Дисертація є рукопис

Робота виконана в Харківській медичній академії післядипломної освіти МОЗ України

Науковий керівник доктор медичних наук, професор **Сергієнко Андрій Миколайович**, Медичний центр «Офтальмологічна клініка професора Сергієнка» лікар-офтальмолог, м. Вінниця

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор, лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки **Шепітько Володимир Іванович**, ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України, завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології, м. Полтава

доктор медичних наук, професор, **Бездітко Павло Андрійович**, Харківський Національний Медичний Університет, завідувач кафедри офтальмології, м. Харків

Захист відбудеться «27» грудня 2016 р. о 13:30 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 ознайомитись в бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м.Харків, вул. Переяславська,23.

Автореферат розісланий «26» листопада 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої ради,
доктор біологічних наук, професор



Л.Ф.Розанов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вивчення патогенезу діабетичної ретинопатії, а також розробка нових методів її лікування є однією з актуальних задач сучасної офтальмології. Діабетична ретинопатія – це одна з основних причин супутньої сліпоти та інвалідності. Вона розвивається у 97 % хворих з інсулінозалежним цукровим діабетом і у 60 % – з інсуліннезалежним цукровим діабетом. (Вітовська О. П. та співавт., 2015).

Непроліферативною ретинопатією страждають 93 млн. хворих на цукровий діабет, проліферативною формою діабетичної ретинопатії майже 17 млн. хворих, а діабетичним макулярним набряком – 12 млн. (Риков С. О., 2015). Діабетична ретинопатія (ДР) найбільш несприятливе ускладнення цукрового діабету (ЦД), оскільки призводить до сліпоти та інвалідності. (Веселовська З. Ф., 2007; Науменко В. А., 2010; Standarts of medical care in diabetes, 2012; Риков С. О., 2015) Факторами ризику розвитку ДР є гіперглікемія, гіпертензія, гіперліпідемія (Abouammoh M. A., 2013; Риков С. О., 2015).

Прогресуючий характер перебігу, тяжкість пошкодження та недостатня ефективність терапії обумовлюють необхідність пошуку нових методів та препаратів для лікування хворих з діабетичною ретинопатією. (Дьомін Ю. А., 2013).

В останнє десятиліття в регенеративній медицині інтенсивно розвивається новий напрямок – застосування біопрепаратів із тканин і клітин фето-плацентарного комплексу (Грищенко В. І. та співавт., 2005; Хасанов А. Г. и др., 2008; Петренко О.Ю. та співавт., 2011; Sun T. et al., 2013; Ranno H., 2013; Гольцев А. М. та співавт., 2015;).

В теперішній час успіхи трансплантології відзначаються досягненнями сучасної кріобіології, яка розробляє методи низькотемпературного консервування клітин та тканин. Ступінь пошкоджень біологічних об'єктів при їх підготовці до консервування (виділення, зберігання, транспортування, техніка трансплантації) в значному ступені впливають на клінічні результати. Клінічна ефективність залежить від життєздатності та функціональної повноцінності донорського матеріалу.

Застосування клітинних препаратів впливає на рівень глюкози крові, холестерину, ліпідну формулу крові, процеси перекисного окислення ліпідів та стабілізує перебіг патологічного процесу, викликаючи регресію різних патоморфологічних та функціональних змін при ЦД (Юрченко Т.Н. та співавт., 1982; Сукач О.М. та співавт., 2001; Тарасов А.І. та співавт., 2001; Цуцаєва А.А., 2001; Дьомін Ю. А., 2013).

Одним із найцікавіших та перспективних напрямків в офтальмології є застосування стромальних клітин у лікуванні ретинопатій. Найбільш вивченим типом стромальних клітин є мезенхімальні стромальні клітини. Вони характеризуються високою пластичністю в тканинах мезенхімальної природи, що дозволяє використовувати їх для заміщення та відновлення функцій пошкоджених тканин (Петренко О. Ю., 2011; Дьомін Ю. А., 2013).

Особливу увагу привертає плацента, яка є природним стимулятором регенеративно-репаративних процесів. Її унікальність полягає в тому, що всі компоненти знаходяться в фізіологічно збалансованому співвідношенні, а також вона містить мезенхімальні стромальні клітини. Трансплантація кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти може надати виражений позитивний вплив на клінічний синдром діабетичної ретинопатії, стабілізацію основних показників гомеостазу та як наслідок покращення морфологічних та функціональних показників органу зору. Надзвичайно важливою є можливість створення запасів плаценти в кріобанку, що дозволяє використовувати її в ургентних ситуаціях. Ще одним вагомим переваженням є те, що застосування плаценти позбавлене морально-етичних заборон. (Прокопюк О. С., 2014).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана в межах науково-дослідницької роботи кафедри офтальмології ХМАПО «Функціональні, клінічні та морфологічні зміни при запальній та судинній патології органу зору, методи лікування» №0114U000522, а також науково-дослідницької теми ІПК і К НАН України «Вивчення впливу кріоконсервування на біологічні властивості стовбурових клітин різного походження при моношаровому і об'ємному культивуванні та експериментальній трансплантації» № 0112U003132.

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження є вивчення дії кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти на динаміку основних метаболічних показників гомеостазу, рівень експресії генів VEGF і BDNF, та морфологічні зміни у щурів з експериментальною діабетичною ретинопатією.

Для досягнення визначеної мети були поставлені наступні задачі:

1. Вивчити особливості морфологічних проявів і ступінь вираженості нейродегенеративних змін сітчастої оболонки у щурів з моделлю стрептозотоцинового діабету 2 типу після використання кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти (кМСКП).

2. Оцінити офтальмоскопічну картину, прояви нейродегенеративних змін ДР при експериментальному ЦД 2 типу.

3. Визначити вплив введення кМСКП на основні метаболічні показники при експериментальному ЦД 2 типу.

4. Вивчити зміни рівней експресії генів фактору росту ендотелію судів (VEGF) та нейротрофічного фактору мозку (BDNF) після застосування кМСКП та дослідити за допомогою зеленого флуоресцентного білка (GFP) можливу міграцію кМСКП.

5. Обґрунтувати доцільність застосування кМСКП при лікуванні ДР у щурів зі стрептозотоциновим ЦД 2 типу.

Об'єкт дослідження – непроліферативна діабетична ретинопатія, обумовлена цукровим діабетом 2 типу, індукованим стрептозотоцином та висококалорійною дієтою.

Предмет дослідження – метаболічні показники, експресія генів VEGF та BDNF, морфологічні зміни сітківки при експериментальному

стрептозотоциновому цукровому діабеті 2 типу та вплив кМСКП на ці показники.

Методи дослідження: офтальмологічні для оцінки стану очного яблука і сітківки, гістологічні для оцінки змін структурних елементів сітківки, молекулярно-біологічні для визначення рівня експресії генів ростових факторів, статистичний аналіз для оцінки достовірності отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджена експресія генів VEGF та BDNF при експериментальній діабетичній ретинопатії. Показано, що у патологічно зміненій сітківці домінує експресія гена VEGF і визначається зменшення експресії гена BDNF

Вперше показано що на тлі застосування кМСКП відбувається збільшення експресії гена BDNF та зниження експресії гена VEGF у сітківці щурів, що забезпечує нейропротекторний захист і антиангіогенний ефект.

Отримані результати доповнюють дані про механізми дії кМСКП, розширюють знання про процеси репараційної регенерації при ДР на фоні застосування препарату кМСКП.

Отримані нові дані про корекцію метаболічних розладів під дією кМСКП. Показана їх роль у нормалізації вуглеводного, про антиоксидантного, ліпідного статусу організму, що сприяє відновленню сітківки.

Вперше показано, що кМСКП не ідентифікуються в сітківці на ранніх стадіях непроліферативної діабетичної ретинопатії, а відновлюючий ефект забезпечується збільшенням рівня експресії гена BDNF.

Сформульовано етіопатогенетичне обґрунтування доцільності застосування кМСКП для лікування експериментальної непроліферативної ДР.

Практичне значення одержаних результатів. Досліджена діабетична ретинопатія на фоні цукрового діабету 2 типу, індукованого висококалорійною дієтою та стрептозотоцином. Вивчені патологічні процеси на ранніх стадіях розвинення діабетичної ретинопатії. Вперше запропоновано використання кМСКП для лікування експериментальної діабетичної ретинопатії.

На основі отриманих даних створено новий метод лікування ДР у експериментальних тварин. Розроблений метод передбачає одноразове внутрішньовенне і інтравітреальне введення кМСКП.

Отримані дані використовуються в лекційних курсах на кафедрах: офтальмології Харківської медичної академії післядипломної освіти, Харківського національного медичного університету, Одеського національного медичного університету; неврології з офтальмологією ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»; очних хвороб Запорізької медичної академії післядипломної освіти; оториноларингології з офтальмологією ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», загальної та клінічної імунології й алергології Харківського національного Університету ім. В.Н. Каразіна.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведений патентно-інформаційний пошук, аналіз даних літератури. Разом з науковим керівником д.мед.н., проф. А. М. Сергієнко визначена тема дисертації, сформульована мета й завдання дослідження, обрані методи їх вирішення. В результаті самостійного вивчення літератури та клінічних досліджень автор теоретично обґрунтувала необхідність і шляхи удосконалення лікування діабетичної ретинопатії. Біохімічні дослідження проводились з консультативною допомогою д.б.н., проф. О. Ю. Петренко та д.б.н., проф. Н. І. Горбенко.

Молекулярно-біологічні дослідження експресії про- і антиангіогенних факторів виконані з консультативною допомогою к.б.н. В. А. Шаблія

Автором особисто проведено всі маніпуляції експериментальним тваринам на всіх етапах спостереження. Дисертанткою створена база даних, на підставі якої проведено аналіз і статистична обробка матеріалу. Висновки сформульовано разом з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на: засіданні Харківського, Дніпропетровського товариств офтальмологів; науково-практичній конференції з міжнародною участю «Реабілітація хворих з патологією органа зору» (Харків, 2014); 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, CRYO 2015, Czech Republic (Ostrava, 2015);

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових праць, з них – 6 статей (6 у співавторстві) 5 в наукових фахових журналах, 1 у закордонному виданні, 2 роботи у тезах науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 154 сторінках комп'ютерного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, розділу власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел, що містить 333 посилань і складає 38 сторінок. Дослідження містить 16 ілюстрацій та 18 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено аналіз сучасного стану проблеми, яка стосується етіопатогенезу та лікування ДР. Узагальнено сучасні підходи до терапії ДР. Визначено перспективні напрямки лікування за допомогою кМСК. На підставі аналізу літератури доведено актуальність і перспективність досліджень щодо застосування кМСКП з метою лікування та профілактики ДР.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводили на моделі ЦД 2 типу на статевозрілих самцях лабораторних щурів лінії Вістар масою 130-160 г. Щурів утримували в стандартних умовах віварію при 12-годинному денному освітленні, температурі повітря – 20-25 °С, вологості повітря – 50-55 %. Всі маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що

використовуються для експериментальних і наукових цілей» (Страсбург, 1986) та постанови IV Національного конгресу з біоетики (Київ, 2010).

Інсулінорезистентність моделювали у щурів протягом десяти тижнів за допомогою висококалорійної (високожирової та високовуглеводної) дієти, яка складалася з 15 % жиру, 25 % сахарози, 1 % жовчних кислот та 59 % стандартного харчування, рекомендованого для даного виду тварин – комбікорм, соковиті корми, кухонна сіль, жири *ad libitum*; джерело води – охолоджена кип'ячена вода з міської мережі в скляних поїлках (Lin S., Yang J. et al., 2010).

Інтактні тварини протягом десяти тижнів отримували стандартну дієту віварію.

Через чотири тижні після початку експерименту щурам, які отримували висококалорійну дієту, внутрішньочеревно вводили цитратний розчин стрептозотоцину в дозі 25 мг/кг маси тіла один раз на тиждень протягом двох тижнів. Контрольні тварини за аналогічною схемою отримували внутрішньочеревно цитратний буфер (Lin S., Yang J. et al., 2010).

Через сім днів після останньої ін'єкції стрептозотоцину всіх експериментальних тварин (30 щурів, 60 очей) розділили на п'ять груп: 1) I група – інтактні тварини; 2) II група – здорові тварини, яким було виконано внутрішньовенне та інтравітреальне введення кМСКП; 3) III група – тварини з моделлю ДР обумовленої стрептозотоциновим цукровим діабетом 2 типу, які не отримували лікування; 4) IV група – тварини з моделлю ДР обумовленої стрептозотоциновим цукровим діабетом 2 типу, які отримували внутрішньовенне та інтравітреальне введення кМСКП; 5) V група – тварини з моделлю ДР обумовленої стрептозотоциновим цукровим діабетом 2 типу, які отримували середовище (збалансований сольовий розчин Хенкса)

Кріоконсервовані мезенхімальні стромальні клітини плаценти вводили однократно, одномоментно внутрішньовенно в дозі 3×10^5 клітин в 333 мкл й інтравітреально в дозі 2×10^4 клітин в 20 мкл контрольним тваринам і щурам з цукровим діабетом 2 типу, індукованим висококалорійною дієтою та стрептозотоцином. Середовище вводилося за аналогічною схемою.

Під загальною внутрішньовенною анестезією (пропофол 3 мг/кг маси) голкою діаметром 360 мкм (інсуліновий шприц), була проведена пункція очного яблука в області лімба. Потім голкою діаметром 200 мкм, поєднаною з 0,01 мл шприцом (Hamilton, Швейцарія), була проведена інтравітреальна ін'єкція кМСКП.

Внутрішньовенне введення кМСКП проводили в хвостову вену щурів.

Глюкозний гомеостаз оцінювали за показниками базальної глікемії, під час тесту толерантності до глюкози (3 г на кг маси тіла) і короткого інсулінового тесту (0,5 Од на кг маси тіла) (Lundholm L., Bryzgalova G. et al., 2008). Рівень глюкози в крові визначали глюкозооксидазним методом за допомогою ферментативного аналізатора глюкози «Ексан-Г» (Литва). Площі під відповідними глікемічними кривими розраховували за допомогою

комп'ютерної програми "Mathlab" (США). У сироватці крові визначали концентрацію фруктозаміну (Baker J., Scragg R. et al., 1991).

Ліпідний обмін вивчали за концентрацією тригліцеридів (ТГ) (Fletcher M.J., 1968), загальних ліпідів (Прохорова М. И., 1965), загального холестерину (Badmon J. J., Badmon L. te al., 1990) і неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК) (Dumcombe W. C., 1963) в сироватці крові на спектрофотометрі Shimadzu UV 1800 (Японія).

Окислювально-відновний гомеостаз оцінювали за рівнем ТБК-активних продуктів (Okawa H., 1978), відновленого глутатіону (Eyer P., 1986), супероксиддисмутази (Орехович В. Н., 1997) і загальної антиоксидантної активності (ЗАА) (Арутютян А. В., 2000) в сироватці крові спектрофотометрически.

Концентрацію фактора некрозу пухлини- α в сироватці крові експериментальних тварин визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою наборів фірми «Вектор-Бест» (Росія).

Концентрацію С-реактивного білка (СРБ) визначали в сироватці крові за допомогою напівкількісного методу латексної аглютинації з чутливістю 0,8-1,0 мг/л СРБ.

Також було проведено виділення та культивування мезенхімальних стромальних клітин (МСК) плаценти щурів, лентивірусну трансдукцію, кріоконсервування МСКП, виділення РНК та проведення кількісного ЗТ-ПЛР та проточну цитофлуориметрію.

Виділення та культивування МСКП щурів. Перед взяттям плаценти самкам щурів на 21-й день вагітності була проведена асфіксія двоокисом вуглецю. Плаценти промивали в збалансованому сольовому розчині Хенкса з додаванням 50 нг/мл стрептоміцину і 100 од/мл пеніциліну. Хоріон розрізали за допомогою хірургічних ножиць та щипців на шматки 2,5×2,5×2,5 мм, а потім промивали у збалансованому сольовому розчині Хенкса. Фрагменти тканини поміщали на чашки Петрі (Sarstedt, США), що містять поживне середовище DMEM з високим вмістом глюкози з додаванням 10 % ФБС (Nucclone, США). Культивували в стандартних умовах, в зволоженій атмосфері при 37 °С і 5 % CO₂, культуральне середовище змінили два рази на тиждень. Клітини пересівали шляхом трипсинізації (0,05 % трипсин, Biohrom, Німеччина), коли конфлюенс колоній досягав 70 % і висівали зі щільністю 5×10³ клітин на см².

Мезенхімальні стромальні клітини плаценти на третьому пасажі експресували маркер мезенхімальних клітин віментін, несли поверхневі маркери CD90, CD44, CD29 та не експресували маркер гемопоетичних клітин CD45.

Трансдукцію кМСКП геном EGFP проводили після досягнення кМСКП 50 % конфлюентності шляхом заміни середовища культивування на вірусомісне середовище, яке містило плазмідні вектори, що кодують капсидні білки віруса psPAX2, рMD2.G та трансфер-вектор, що містить кДНК EGFP та репортерного *CorGFP*, яке було зібрано з трансфікованих клітин 293T. Перед додаванням середовища центрифугували 10 хв при 6000 g

і 4 °С і при зараженні використовували супернатант, що містив 8 μл/мл Hexadimethrine bromide (SIGMA, Німеччина).

Повторне зараження проводили через 1 добу культивування МСК.

Через 2 доби культивування поживне середовище у МСК плаценти щурів, що містило лентивірусні частки, замінювали на нове. Детекція EGFP в інфікованих клітинах проводилася за допомогою флуорисцентної мікроскопії та проточного цитофлуориметричного аналізу.

Для кріоконсервування МСК плаценти щурів знімали з підкладки за допомогою 0,05 % розчину трипсину-ЕДТА (Biochrom, Німеччина). Для інгібування трипсину до суспензії клітин вносили ФБС (Gibco, Німеччина) до кінцевої концентрації 15 %. Клітини відмивали від трипсину шляхом центрифугування 5 хв. при 300 g та осад клітин ресуспендували в розчині Хенкса. Кріоконсервування кМСКП проводили за допомогою програмного заморозувача ЗП-6.00.00.00 (спеціальне конструкторсько-технологічне бюро з дослідним виробництвом Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України) в кріоконтейнерах (Greiner Bio-One, UK). До суспензії кМСКП повільно додавали розчин Хенкса з 10 % ДМСО у співвідношенні 1:1. Процес охолодження починали з 20 °С зі швидкістю 1 °С на хвилину до мінус 6 °С, потім проводили ініціацію кристаллоутворення, для чого при цій температурі препарати витримували протягом 10 хв. Після завершення кристалізації кріоконтейнери охолоджували зі швидкістю 0,3 °С на хв до мінус 35 °С, потім зі швидкістю 5 °С на хв до мінус 50 °С, далі зі швидкістю 10 °С на хв до мінус 140 °С. Після цього процес охолодження в заморозувачу зупиняли і переносили клітини в рідкий азот (мінус 196 °С) для довгострокового зберігання. (Лобинцева Г. С., 2002).

Для імунофенотипування МСК були використані флуорохромом помічені моноклональні антитіла: анти-CD90-PE (Becton Dickinson, США), анти-CD45-APC-Cy7 (Becton Dickinson, США), CD44-FITC (GeneTex, США). Для визначення CD29 клітини фіксували в 2 % забуференому параформальдегіді протягом 20 хв, пермабілізацію проводили 0,3 % сапоніном протягом 30 хв, потім фарбували кролячими анти-інтегрин β-1/CD29 моноклональними антитілами (GeneTex, США); козячий анти-кролячий Alexa405 (Invitrogen, США) використовували в якості вторинного антитіла. Фенотипування проводили на клітинному сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США), використовуючи FACS DIVA 6.1.2 програмне забезпечення. Контрольні зразки були використані для регулювання компенсації перекриття флуорохромів: unstained control, single stained control and fluorescence minus one control.

Для визначення рівня експресії генів VEGF та BDNF в зразках сітківки очей щурів проводилася ПЛР у реальному часі (РЧ ПЛР). Для цього фрагменти тканини сітківки поміщали в консервуючий розчин RNA later (Lifetechnologies, США) для запобігання руйнування мРНК. Далі тканину сітківки промивали в фосфатно-сольовому буфері та виділяли тотальну мРНК за допомогою AccuZol™ реагенту (BioNeer, США) згідно протоколу виробника. Щоб позбутися залишків геномної ДНК, виділені мРНК (1 мкг на

реакцію) обробляли DNase I (ThermoScientific, США) згідно протоколу виробника. кДНК отримували шляхом зворотної транскрипції зразків мРНК з використанням Revert AidFirst Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific). РЧ ПЛР аналіз отриманих кДНК проводили з використанням, специфічних праймерів:

- а) АСТВ – кодуюча 5′- ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA -3′;
- б) антикодуюча 5′- TACGACCAGAGGCATACAGGGACAA -3′;
- в) VEGF– кодуюча 5′- CTGGCTTTACTGCTGTACCTCCACC -3′;
- г) антикодуюча 5′- GGCACACAGGACGGCTTGAА -3′;
- д) BDNF – кодуюча 5′- AGCTGAGCGTGTGTGACAGT -3′;
- е) антикодуюча 5′- ACCCATGGGATTACACTTGG -3′) та

Maxima SYBR Green qPCR Master Mixes набору (Thermo Scientific) згідно протоколу виробника. ПЛР-ампліфікацію (приблизно 100 нгкДНК на реакцію) проводили за наступною схемою: перший цикл – 95 °С на 10 хв; 35 циклів – 95 °С на 20 с, 61 °С на 30 с, 72 °С на 30 с. Для отримання відносних рівней експресії генів VEGF та BDNF проводили біоінформативний аналіз отриманих даних з використанням порівняльного ΔCT методу, де рівень експресії гена

$$(X) = 2^{-\Delta\text{CT}}, (\Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{ген інтересу}} - \text{CT}_{\text{контрольний ген}}),$$

або методу порівняльного $\Delta\Delta\text{CT}$ методу,

$$\text{де рівень експресії гена } (X) = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}},$$

$$(\Delta\Delta\text{CT} = ((\text{CT}_{\text{ген інтересу}} - \text{CT}_{\text{контрольний ген}})_{\text{група норма}} -$$

$(\text{CT}_{\text{ген інтересу}} - \text{CT}_{\text{контрольний ген}})_{\text{група патологія}})$.

В якості контрольного гена, щодо якого визначали рівень експресії VEGF і BDNF був обраний ген бета актину АСТВ. Для визначення експресії АСТВ використовували наступні праймери:

- а) кодує 5'ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA-3 '
- б) антикодуюча 5' - TACGACCAGAGGCATACAGGGACAA-3 '.

Дослідження очного дна щурів проводили за допомогою фундус-камери Opthomed Pro (Фінляндія).

Для проведення морфологічного дослідження тварин виводили з експерименту методом повітряної емболії на тлі глибокого наркозу шляхом внутрішньом'язового введення 5 % розчину тіопенталу натрію. Для вивчення структури змін сітчастої оболонки було проведено патоморфологічне дослідження заднього сегмента ока тварин. Для виготовлення гістологічних препаратів була проведена енуклеація і фіксація матеріалу в 10 % розчині формаліну для подальшого гістологічного дослідження сітчастої оболонки. Для гістологічного дослідження застосовували загальні методи забарвлення препаратів тканин гематоксилін-еозином. (Лилли Л.,1969).

Фотореєстрацію препаратів сітківки щурів проводили цифровою камерою Sigeta Ucmos 3100. Морфометрію проводили за допомогою програми TourTekView 3.7.939.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням комп'ютерної програми SPSS v.19.0 за допомогою наступних методів: первинної описової статистики, t-критерія Стьюдента для незалежних вибірок, кореляційного і дисперсійного аналізу з обчисленням коефіцієнта кореляції Пірсона (r) та критерію Фішера (F). Перевірка на нормальність проводилася за критерієм згоди Колмогорова-Смирнова. Критичний рівень значимості (P) для усіх перевіряємих статистичних гіпотез приймався рівним 0,05.

Результати власних досліджень та їх обговорення. У результаті проведеного експерименту встановлено, що введення стрептозотоцина щурам, що знаходяться на висококалорійної дієті. Це призводило до розвитку відносної інсулінової недостатності, що підтверджувалося підвищенням рівня базальної глікемії ($(8,35 \pm 0,18)$ ммоль/л) в порівнянні з контрольними тваринами. У той же час, показники постпрандіальної гіперглікемії у експериментальних щурів ($(11,85 \pm 0,56)$ ммоль/л) підтверджують розвиток інсулінрезистентності та інтолерантності до глюкози, що дозволяє верифікувати наявність у них ЦД 2 типу.

Встановлено, що внутрішньовенне і інтравітреальне введення кМСКП діабетичним щурам гальмує розвиток інсулінрезистентності, яке підтверджується зниженням базальної та постпрандіальної гіперглікемії відповідно на 25 % та 35 % щодо групи щурів з ЦД та на 25,5 % та 36 % щодо групи ЦД+середовище ($P < 0,01$). Застосування кМСКП також супроводжувалося покращенням толерантності до вуглеводів, підтвердженням чому було зменшення площі під глікемічними кривими під час проведення внутрібрюшинного тесту толерантності до глюкози на 30 % ($P < 0,01$) у порівнянні з групою тварин з ЦД.

Крім того, застосування кМСКП сприяло збільшенню чутливості до інсуліну на що вказувало майже дворазове збільшення відповідного коефіцієнту ($P < 0,01$), котрий практично не відрізнявся від рівня інтактного контролю.

Покращення глікемічного контролю під впливом кМСКП підтверджувалось зниженням концентрації фруктозаміна у сироватці крові на 30 % ($P < 0,05$) у порівнянні з групою тварин з ЦД.

Таким чином, застосування кМСКП призводить до поліпшення глюкозного гомеостазу, знижує базальну гіперглікемію, інтолерантність до глюкози, інсулінрезистентність і концентрацію фруктозаміну в сироватці крові щурів з ЦД 2 типу.

Також встановлено, що застосування кМСКП у діабетичних щурів приводило до зниження концентрації загальних ліпідів і тригліцеридів у сироватці крові щурів з ЦД відповідно на 20 % та 25 % й на 21 % та 23,3 % у щурів в групі ЦД+середовище ($P < 0,05$).

В результаті проведених досліджень встановлено, що ЦД 2 типу супроводжується інтенсифікацією процесів ліпідної пероксидації, на що вказує істотно підвищений рівень первинних продуктів – дієнових кон'югатів у сироватці крові щурів ($(3,84 \pm 0,25)$ мкмоль/л) у порівнянні з інтактним

контролем ($(1,55 \pm 0,20)$ мкмоль/л). У той же час, у щурів з ЦД, відзначалося істотне зниження загальної антиоксидантної активності ($(7,57 \pm 0,94)$ ум.од./л), концентрації відновленого глутатіону ($(0,31 \pm 0,03)$ ммоль/л) та активності каталази в сироватці крові ($(13,15 \pm 0,35)$ мкат/л), що свідчить про послаблення антиоксидантного захисту в умовах ЦД 2 типу.

Використання кМСКП призводило до послаблення оксидативного стресу, про що свідчив достовірно знижений рівень дієнових кон'югатів у сироватці крові щурів ($(2,52 \pm 0,16)$ мкмоль/л) щодо групи тварин з ЦД ($(3,84 \pm 0,25)$ мкмоль/л).

В результаті проведених досліджень встановлено, що ЦД 2 типу супроводжується розвитком прозапального процесу, що підтверджується майже дев'ятикратним підвищенням концентрації СРБ в сироватці крові експериментальних тварин в порівнянні з інтактними щурами ($P < 0,05$).

Введення кМСКП тваринам з ЦД 2 типу призводило до майже дворазового зниження концентрації СРБ в сироватці крові в порівнянні з щурами з ЦД ($P < 0,01$). Підтвердженням розвитку прозапального стану на даній моделі ЦД було підвищення концентрації фактора некрозу пухлини- α (ФНП- α) в сироватці крові експериментальних тварин більше, ніж у три рази ($P < 0,05$).

Використання кМСКП призводило до зниження інтенсивності запального процесу, про що свідчила знижена на 30 % концентрація ФНП- α в сироватці крові щурів щодо групи тварин з ЦД та на 29,5 % щодо групи ЦД+середовище ($P < 0,01$).

При клінічному обстеженні щурів будь-яких ознак токсикоалергічної реакції (дерматит повік, хемоз, алергічні інфільтрати, помутніння кришталика, ексудативної реакції склоподібного тіла), а також змін судів на введення кМСКП не визначалося.

У тварин контрольної та експериментальної групи в післяопераційному періоді патологічних змін не виявлено. Ні на одному етапі дослідження ознак запальної реакції з боку досліджених і контрольних очей не було.

При гістологічному вивченні встановлено, що морфологічними ознаками ранньої нейродегенерації сітківки при ДР є зниження кількості гангліонарних клітин, витончення внутрішнього сітчастого шару, витончення сітківки в цілому, посилення гетерохроматизації ядер, конденсація хроматину (рис. 1).

Стінка судів потовщена за рахунок відкладень ліпогіаліну, а також плазморагії та геморагії (рис. 2, 3).

Таким чином, зміни в сітківці щурів з стрептозотоциновим ЦД слід охарактеризувати як початкові нейродегенеративні на тлі васкулопатії.

Внутрішньовенне і інтравітреальне введення кМСКП дозволяє нормалізувати морфологічну структуру сітчастої оболонки щурів зі стрептозотоцинового ЦД 2 типу (рис. 4).

У літературі є одиничні експериментальні роботи, присвячені вивченню впливу кМСКП на проліферативний процес (Чеснокова Н.Б. и др.,

2009). У зв'язку з цим становить інтерес подальше вивчення впливу кМСКП на процеси репаративної регенерації при розвитку ДР.



Рис. 1. Сітківка. Група цукровий діабет. Окраска гематоксилін-еозином. Ядра багаті гетерохроматином.

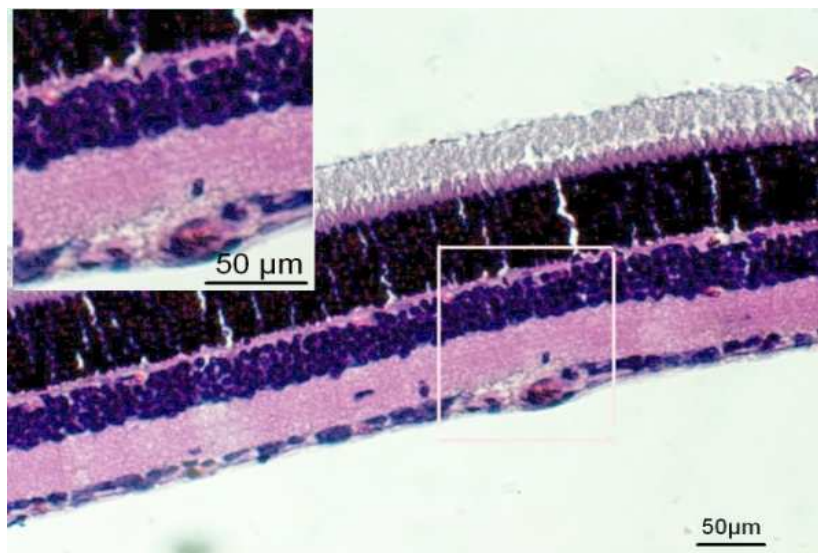


Рис. 2. Сітківка. Група цукровий діабет. Окраска гематоксилін-еозином. Потовщена стінка судів; проліферація ендотеліоцитів та періцитів; відкладення ліпогіаліну.

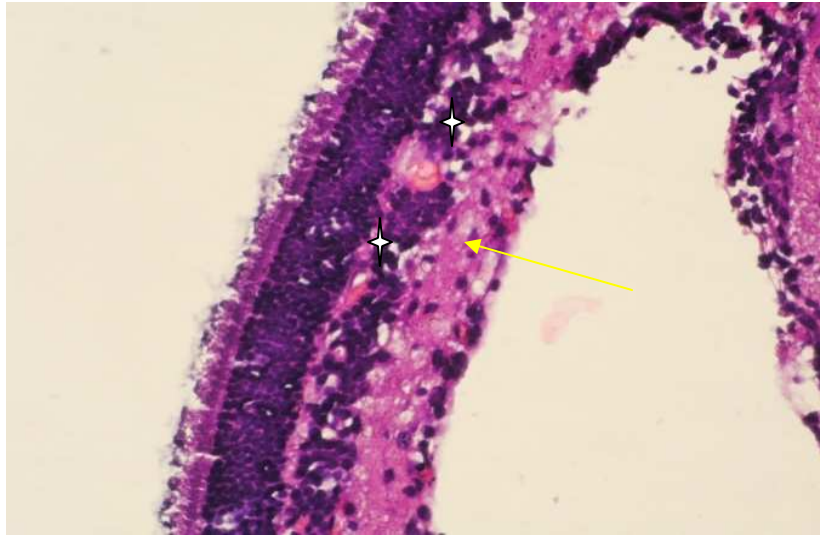


Рис. 3. Сітківка. Група ЦД. Окраска гематоксилін-еозином. Збільшення x400:
 (↑) – набряк внутрішнього сітчастого шару;
 (*) – плазморагії та геморагії у внутрішньому сітчастому та ядерному шарах.

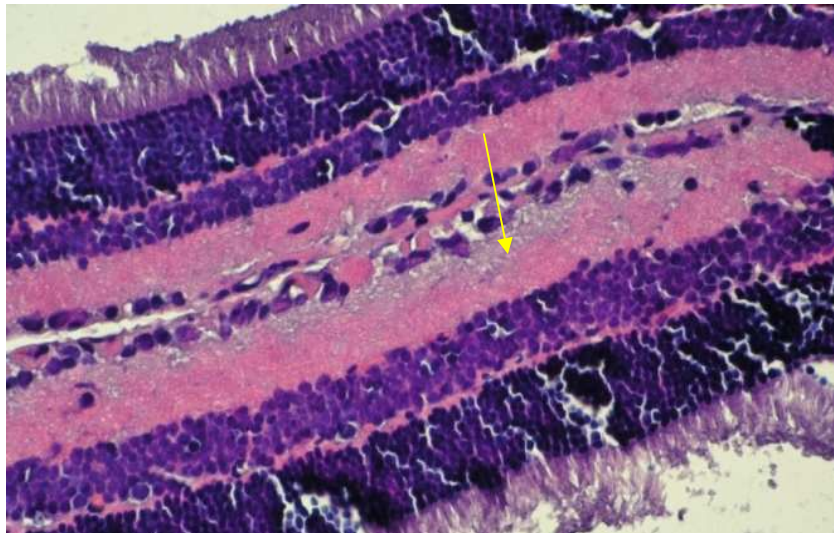


Рис. 4. Сітківка. Група ЦД+кМСКП. Окраска гематоксилін-еозином. Збільшення x400:
 (↑) – набряк внутрішнього сітчастого шару. проліферація ендотеліоцитів та періцитів; відкладення ліпогіаліну.

У зв'язку з чим вивчався рівень експресії генів BDNF та VEGF в сітківці щурів.

Якісний і кількісний аналіз рівня експресії ростових факторів в сітківці показав наступні результати (рис. 5).

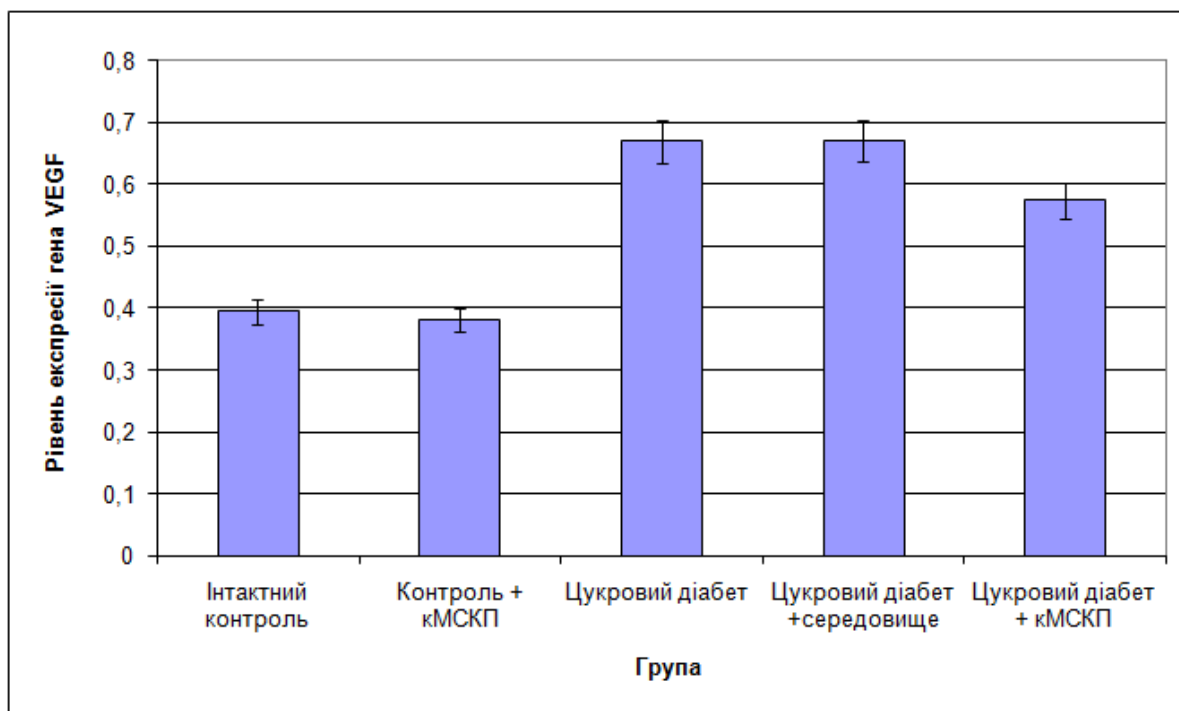


Рис. 5. Показники рівня експресії гена VEGF у експериментальних тварин.

На тлі застосування кМСКП спостерігалось достовірне зниження рівня експресії гена VEGF щодо групи ЦД та ЦД+середовище на 14 % (рис. 5). Це може свідчити про антиангіогенну дію кМСКП. Таким чином, у щурів з ЦД, індукованим стрептозотоцином і висококалорійної дієтою встановлено, що одноразове внутрішньовенне і інтравітреальне введення МСКП знижує експресію гена VEGF в сітківці, що по всій видимості гальмує зростання новоутворених судин. Ця гіпотеза підтверджується отриманими нами результатами патогістологічного дослідження і сприяє профілактиці розвитку ДР.

Встановлено, що при ЦД 2 типу спостерігається зниження рівня експресії гена BDNF, що говорить про посилення процесів нейродегенерації.

Якісний і кількісний аналіз ростових факторів показав, що найбільші піки концентрації були досягнуті нейротрофічним фактором BDNF у щурів з трансплантованими кМСКП. Рівень експресії гена BDNF у групі ЦД+кМСКП був на 41 % більше щодо групи ЦД та на 44% щодо групи ЦД+середовище (рис. 6).

Збільшення рівня експресії гена BDNF в сітківці щурів з трансплантованими кМСКП підкреслює високий потенціал нейропротекторної дії (Talahalli A., Zarini S. et al., 2010).

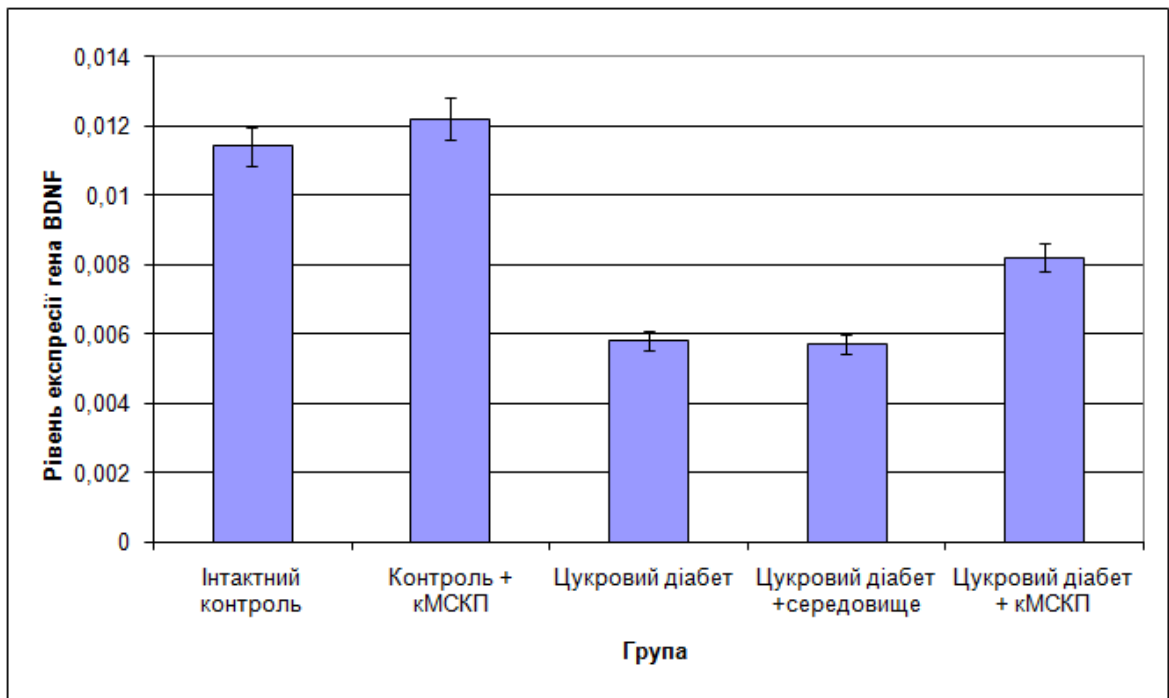


Рис. 6. Показники рівня експресії гена BDNF у експериментальних тварин.

Для вивчення можливої міграції нами вивчались кМСКП трансдуковані лентівірусним вектором, що містить ген EGFP під контролем сильного цитомегаловірусного промотера конститутивно експресують GFP, як на рівні мРНК, так і білка.

Після трансдукції МСК експресія EGFP була виявлена, як на рівні транскрипту методом зворотно-транскрипційної ПЛР, так і на рівні білка при дослідженні на проточному цитофлуориметрі (рис. 7).

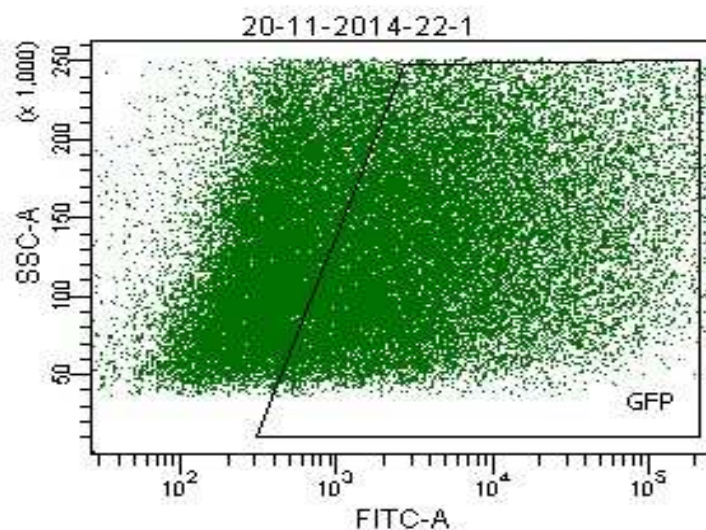


Рис. 7. Гістограма експресії GFP+ у культурі клітин кМСКП.

Відсутність транскрипту гена EGFP в сітківці щурів після введення кМСКП свідчить про відсутність їх знаходження в цих тканинах (рис. 8).

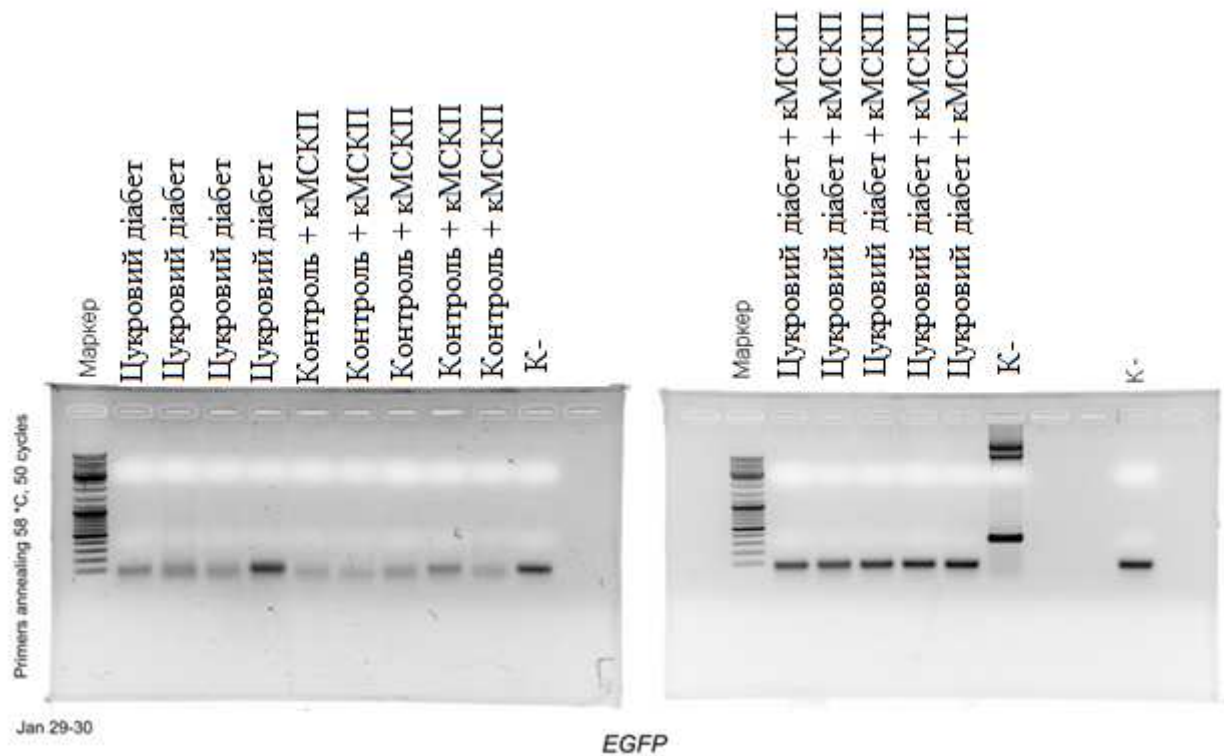


Рис. 8. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу кДНК тканини сітківки через 21 день після трансплантації кМСКП, трансгенних за геом EGFP з праймерами до EGFP; CD511-EGFP (K +) – позитивний контроль, кДНК клітин трансформованих генетичною конструкцією CD511-EGFP.

Таким чином, трансплантовані клітини не досягають тканини сітківки на ранніх стадіях ДР, а отже нейропротекторний захист забезпечується стимуляцією експресії гена BDNF кріоконсервованими мезенхімальними стромальними клітинами плаценти.

За результатами дисперсійного аналізу виявлено значний вплив нейротрофічного фактора BDNF на товщину сітківки ($F = 4,483$; $P = 0,008$) і кількість гангліонарних клітин сітківки ($F = 13,693$; $P = 0,001$).

Проведений кореляційний аналіз показав наявність високої достовірної залежності ($r > 0,7$) між біохімічними показниками, такими як базальна гіперглікемія, загальна антиоксидантна активність, концентрація дієнових кон'югатів, концентрація ФНО- α , СРБ у сироватці крові та морфологічними показниками ока, такими як загальна товщина, товщина гангліонарного шару сітківки, кількість клітин у гангліонарному шарі сітківки.

Пошук адекватних методів лікування ДР є актуальним завданням сучасної офтальмології.

Вже на ранніх стадіях розвитку ЦД 2 типу виникають зміни основних системних гомеостатичних показників, що призводить до вторинних змін в тканинах ока. Тому обґрунтованим є застосування терапевтичних засобів багатофакторної системної дії та використання засобів локальної дії для нормалізації пошкодженої сітківки.

Отримані наукові дані доводять доцільність використання кМСКП при внутрішньовенному введенні в дозі 3×10^5 клітин на 333 мкл та інтравітреальному введенні у дозі 2×10^4 клітин на 20 мкл для профілактики розвитку ДР у експериментальних тварин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної наукової задачі – експериментальне обґрунтування комбінованого (внутрішньовенного та інтравітреального) застосування кМСКП для лікування ДР. Описано механізми дії введення кМСКП та їх висока терапевтична ефективність.

1. При ЦД 2 типу, індукованому стрептозотоцином і висококалорійною дієтою через 6 тижнів після початку експерименту в сітчастій оболонці щурів визначається зниження кількості гангліонарних клітин, витончення внутрішнього сітчастого шару та витончення сітківки в цілому. Внутрішньовенне і інтравітреальне введення кМСКП дозволяє нормалізувати морфологічну структуру сітчастої оболонки.

2. При офтальмоскопічному дослідженні видимі зміни очного дна відсутні на фоні розвитку морфологічних змін, що свідчить про розвиток експериментальної непроліферативної діабетичної ретинопатії.

3. Введення кМСКП нормалізує основні метаболічні показники такі як: рівень концентрації глюкози, фруктозаміну, ліпідів, тригліцеридів, дієнових кон'югатів, відновленого глутатіону, СРБ, ФНО- α , загальної антиоксидантної активності і є патогенетично обґрунтованим методом лікування ДР обумовленого стрептозотоциновим ЦД 2 типу, оскільки впливає на порушені показники вуглеводного обміну, прооксидантно-антиоксидантної системи та ліпідного статусу експериментальних тварин, а також має протизапальну дію.

4. При введенні кМСКП в сітківці експериментальних тварин (ЦД + кМСКП) рівень експресії гена BDNF збільшується на 41 % порівняно з групою ЦД, а рівень експресії гена VEGF знижується на 14 %. Отже, кМСКП надають виражену нейропротекторну і антиангіогенну дію.

5. Трансплантовані кМСКП не досягають тканини сітківки на ранніх стадіях непроліферативної діабетичної ретинопатії, однак стимулюють експресію гена BDNF і пригнічують експресію гена VEGF.

6. Проведені експериментальні дослідження довели нейропротекторну дію кМСКП. Механізм дії кМСКП полягає в прямому стабілізуючому і протекторному впливі на гангліонарні клітини сітківки нейротрофічних факторів, а також опосередкованій дії – нормалізації метаболічних

показників вуглеводного обміну, прооксидантно-антиоксидантної системи та ліпідного статусу експериментальних тварин.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дёмин, Ю. А. Эффективность использования криоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты в коррекции оксидативного статуса крыс с сахарным диабетом 2 типа [Текст] / Ю. А. Дёмин, М. Ю. Дёмина // Міжнародний медичний журнал. – 2015. – Т. 21, № 3. – С.55-58. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження, статистична обробка даних).*

2. Дёмин, Ю. А. Патоморфологические изменения сетчатой оболочки крыс при стрептозотоциновом диабете 2 типа после введения криоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты [Текст] / Ю. А. Дёмин, М. Ю. Дёмина // Світ медицини та біології. – 2015. – № 4 (54). – С. 117-120. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження).*

3. Влияние криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток плаценты на провоспалительное состояние при экспериментальном сахарном диабете 2 типа [Текст] / Ю. А. Дёмин, М. Ю. Дёмина, А.Н. Сергиенко, В.А. Шаблей // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, № 4. – С. 371-378. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження).*

4. Demin, Yu. A. Application efficiency of cryopreserved placental mesenchymal stem cells in correction of dyslipidemia in experimental streptozotocin type 2 diabetes [Text] / Yu. A. Demin, M. Yu. Demina // Проблеми безперервної медичної освіти та науки. – 2015. – № 4 (20). – С.38-40. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження, статистична обробка даних).*

5. Дёмин, Ю. А. Перспективность использования мезенхимальных стромальных клеток с целью профилактики и терапии диабетической ретинопатии [Текст] / Ю. А. Дёмин, М. Ю. Дёмина // Міжнародний медичний журнал. – 2015. – Т. 21, № 4. – С. 69-71. *(Здобувачем проведена підготовка матеріалів для експериментального дослідження).*

6. Дёмин, Ю. А. Изучение потенциальной роли криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в ингибировании нейродегенеративных изменений сетчатки при стрептозотоциновом диабете 2 типа по динамике изменений VEGF и BDNF [Текст] / Ю. А. Дёмин, М. Ю. Дёмина, А.Н. Сергиенко // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – Ч. 3, № 1 (43). – С. 49-51. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження, статистична обробка даних).*

7. Дёмин, Ю. А. Эффективность применения криоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты в лечении ретинопатии при экспериментальном сахарном диабете 2 типа [Текст] / Ю. А. Дёмин, М. Ю. Дёмина // Реабілітація хворих з патологією органу зору: матеріали науково-

практичної конференції з міжнародною участю, Харків, листопад 2014 р. – Харків, 2014. – С. 28-29.

8. Domina, M. Yu. Influence of cryopreserved mesenchymal stem cells of placenta on glucose homeostasis in rats with experimental diabetes mellitus [Text] / M. Yu. Domina, Yu. A. Domin, // Cryo 2015, 52th Annual Meeting of the Society for Cryobiology : abstracts, Ostrava, Czech, July 26-29 2015. – Ostrava, 2015. – P. 60. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження).*

АНОТАЦІЯ

Дьоміна М. Ю. Застосування кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти при лікуванні діабетичної ретинопатії (експериментальне дослідження). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2016.

Дисертаційна робота присвячена вивченню основних метаболічних показників гомеостазу та рівня експресії генів VEGF та BDNF у сітківці щурів з експериментальним цукровим діабетом 2 типу та впливу на них кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти.

У роботі отримано експериментальне обґрунтування можливості використання кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти з метою нормалізації метаболічних показників, покращення функціональних та морфологічних показників органу зору та стабілізації перебігу патологічного процесу.

Застосування кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин плаценти може сприяти вираженому позитивному впливу на клінічний перебіг непроліферативної діабетичної ретинопатії.

Ключові слова: кріоконсервовані мезенхімальні стромальні клітини плаценти, діабетична ретинопатія, VEGF, BDNF.

АННОТАЦИЯ

Демина М. Ю. Использование криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток плаценты при лечении диабетической ретинопатии (экспериментальное исследование). – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.35 – кріомедицина. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2016.

Диссертационная работа посвящена изучению основных метаболических показателей гомеостазу и уровня экспрессии генов VEGF и BDNF у крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа и влияния на них системного и интравитреального введения криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток плаценты.

В результате проведенных исследований показано, что при системном и интравитреальном введении криоконсервированных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в дозе 3×10^5 клеток на 333 мкл и 2×10^4 клеток

на 20 мкл соответственно наблюдается нормализация основных метаболических показателей углеводного обмена, прооксидантно-антиоксидантной системы и липидного статуса, а также морфологической структуры сетчатки. Также показано, что при использовании кМСКП в сетчатке экспериментальной группы животных уровень экспрессии гена BDNF увеличился на 41 % по сравнению с группой животных с диабетом, а уровень экспрессии гена VEGF снизился на 14 % соответственно. Доказано, что кМСКП на ранних стадиях непролиферативной ДР не проникают в сетчатку, но стимулируют экспрессию гена BDNF и угнетают экспрессию гена VEGF.

В результате проведенного дисперсионного анализа, доказано значительное влияние BDNF на толщину сетчатки и количество клеток в ганглиозном слое сетчатки. Проведенный корреляционный анализ между биохимическими показателями, характеризующими состояние гликемического контроля, про- и антиоксидантного баланса, провоспалительного состояния и морфологическими показателями сетчатки показал протективный эффект кМСКП в отношении ДР, что подтверждает патогенетически обоснованную целесообразность использования предложенного метода клеточной терапии.

Ключевые слова: криоконсервированные мезенхимальные стромальные клетки плаценты, диабетическая ретинопатия, VEGF, BDNF.

ANNOTATION

Demina M.Yu. Application of cryopreserved placental mesenchymal stromal cells to treat diabetic retinopathy. – The manuscript.

Dissertation for the candidate of medical sciences degree in specialty 14.01.35 – cryomedicine. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2016.

The thesis is devoted to the study of basic metabolic indices of homeostasis and the expression level of genes VEGF and BDNF in retinas of the rats with experimental type 2 diabetes and the effect on them of cryopreserved mesenchymal stromal cells of placenta.

In this paper, there was experimentally grounded the possibility of using cryopreserved placental mesenchymal stromal cells to normalize metabolic indices, to improve functional and morphological parameters of the vision and stabilization of pathological process.

Use of cryopreserved placental mesenchymal stromal cells can promote a pronounced positive effect on clinical syndrome of diabetic retinopathy.

Key words: cryopreserved mesenchymal stromal cells of placenta, diabetic retinopathy, growth factors, VEGF, BDNF.

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ДР – діабетична ретинопатія

ЗАА – загальна антиоксидантна активність

κМСКП – кріоконсервовані мезенхімальні стромальні клітини плаценти

МСК – мезенхімальні стромальні клітини

НЕЖК – неестерифіковані жирні кислоти

СРБ – С-реактивний білок

ТГ – тригліцериди

ФНП- α – фактор некрозу пухлини - α

ЦД – цукровий діабет

BDNF – мозковий фактор росту

IFG – інсуліноподібний ростовий фактор

GFP – зелений флуоресцентний білок

VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту