

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

СВІДКО КАТЕРИНА МИКОЛАЇВНА

УДК 617.713: 615.361.013.8.018.5.014.41

**КОМПЕНСАЦІЯ ЛІМБАЛЬНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ РОГІВКИ
КРІОКОНСЕРВОВАНИМИ ЯДРОВІСНИМИ КЛІТИНАМИ КОРДОВОЇ
КРОВІ ЛЮДИНИ**

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

Дьомін Юрій Альбертович,

зав. кафедри офтальмології Харківської медичної академії післядипломної освіти, МОЗ України

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, кафедра гістології, цитології та ембріології, завідувач кафедри

доктор медичних наук, професор кафедри офтальмології НМУ ім. О.О. Богомольця

Веселовська Зоя Федорівна

член-кореспондент Національної академії медичних наук України, Заслужений лікар України,

Лауреат державної премії України в галузі науки і

техніки, лікар-офтальмолог вищої категорії, директор

Київського офтальмологічного центру

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. Втрата зору внаслідок ураження рогівки істотно впливає на якість життя людини, тому це є економічною та соціальною проблемою (Попандопуло А.Г., 2013). Доведено, що на патогенез багатьох захворювань (особливо хронічних) органа зору людини впливає пошкодження клітин зони лімба (Абдылдаєвна А.А., 2009). Внаслідок дії шкідливих чинників відбувається як первинна деструкція тканини, так й ініціюються патологічні зміни в самій рогівці: зменшується кількість лімбальних стовбурових клітин і погіршується стан їх мікрооточення через нестачу специфічних ростових факторів (Caplan A.I., 2006; Russell H.C., 2010; Шаймарданова Л.Р., 2011; Lu R., 2012).

На даний час у клінічній практиці широко застосовуються традиційні консервативні методи лікування лімбальної недостатності рогівки (ЛНР): аутокон'юнктивальна пластика, використання лікувальних м'яких контактних лінз, гормонотерапія, призначення медичних препаратів, які сприяють регенерації епітелію рогівки (Bliss T., 2007; Yoon K.C., 2007; Ebert A.D., 2009; Girolamo N. Di, 2009; Baylis O., 2011). При важких травмах ока застосовують такі радикальні методи, як трансплантація лімбальних ауто- й алогографтів, амніотичної мембрани та кон'юнктиви (Sitalakshmi G., 2009; Han E.S., 2011; Chakraborty A., 2013; Zakaria N., 2014). Вказані методи є ефективними, але у більшості випадків вони недоступні та вимагають від лікаря певних навичок і наявності запасу трансплантатів, які повинні зберігатися у банку біологічних об'єктів. В клінічній практиці (Репин В.С., 2002; Abdiu O., 2008; Ahmad S., 2012) та, зокрема, в офтальмології (C.J. Cain, 2013; Copley M.R., 2012) для лікування багатьох патологій застосовують клітинну і тканинну терапію (Cho P.S., 2008; Sugiyama H., 2008; Ang L.P., 2011; Hall K.M., 2012; Harper H., 2015). Поширюється застосування кордової крові людини (ККЛ), яка є джерелом стовбурових, гемопоетичних стовбурових і мезенхімальних стовбурових клітин із потужним клоногенним потенціалом, а її плазма містить багато клітинних біоактивних речовин і ростових факторів (Nguyen V.H., 2008; Kim J.Y., 2010; Joyce N. C., 2012; Rich I.N., 2015; Fok E., 2015]. Гемопоетичний потенціал кордової крові за кількістю та якістю ранніх стовбурових клітин не тільки не поступається даному показнику кісткового мозку дорослої людини, а й за деякими показниками навіть перевищує його (Lim I. J., 2014; Pope B., 2014). Кордова кров людини має низьку імуногенність (Rich I.N., 2013). Для зберігання кордової крові людини необхідне створення низькотемпературних банків, що дозволить сертифікувати біоматеріал, проводити його бактеріальний аналіз, підбирати матеріал для трансплантації та доставляти проби в клініку для надання необхідної допомоги пацієнтам (Allen D., 2013).

Таким чином, вирішення проблеми лікування ЛНР залежить від пошуку нових доступних ресурсів клітинної терапії, що дозволить відновити фізіологічний перебіг репаративних процесів і

експериментально довести можливість застосування кріоконсервованої кордової крові людини в офтальмологічній практиці.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках тематичного плану Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за темою: «Вивчити механізм регенераційних процесів шляхом дослідження структурних і деяких метаболічних показників організму експериментальних тварин після трансплантації плаценти в умовах атеросклерозу» (№ держреєстрації 0106U002170).

Мета дослідження: обґрунтувати можливість застосування кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини (кЯКККЛ) для відновлення структурно-функціонального статусу і корекції рогівки в експериментальній моделі ЛНР.

Завдання дослідження:

1. Розробити адекватну експериментальну модель ЛНР ока кролика.
2. Оцінити особливості впливу кріоконсервування на збереження структури та функції ЯКККЛ, які потенційно можуть забезпечити терапевтичний ефект при лікуванні ЛНР.
3. Визначити дозу кЯКККЛ та розробити метод введення в око експериментальної тварини з індукцією ЛНР.
4. Дослідити стан Т-клітинної ланки імунітету у кроликів із індукцією ЛНР і після введення кЯКККЛ.
5. Оцінити характер змін концентрації цитокінів ІФН- α і ІФН- γ у сльозовій рідині та сироватці крові у тварин із індукцією ЛНР і після лікування.
6. Дати порівняльну характеристику патоморфологічних змін у рогівці ока кролика при розвитку ЛНР і після введення кЯКККЛ.
7. Оцінити характер накопичення ростових факторів у тканинах ока після введення кЯКККЛ.
8. Провести оцінку клінічного перебігу експериментальної ЛНР при застосуванні кЯКККЛ.

Об'єкт дослідження – стан структурно-функціональних характеристик рогівки кролів під час експериментальної ЛНР та після використання кЯКККЛ.

Предмет дослідження – кріоконсервовані ядровмісні клітини кордової крові людини.

Методи дослідження: кріобіологічний – з метою встановлення оптимальних умов кріоконсервування та збереження біологічного матеріалу; імунологічний – для виявлення стану Т-клітинної ланки імунітету, характеру накопичення ростових факторів у тканинах ока тварин, змін ІФН- α і ІФН- γ у сльозовій рідині та крові; гістологічний – для виявлення патоморфологічних змін в тканині ока кролика при розвитку ЛНР і після введення кЯКККЛ; клінічний – для встановлення ефективності

застосування кЯКККЛ; статистичний – для встановлення достовірності отриманих результатів.

Наукова новизна і практична значущість роботи. Вперше показана можливість використання кЯКККЛ для лікування і розшифровки механізму дії в умовах розвитку експериментальної ЛНР, доведена ефективність даного методу в порівнянні з традиційною терапією.

Вперше досліджено і встановлено факт позитивного впливу кЯКККЛ на Т-клітинну ланку імунітету, характер накопичення ростових факторів у тканинах ока тварин та ІФН- α і ІФН- γ у слъзовій рідині та крові, показники крові, клінічний перебіг, репарацію рогівки при експериментальній ЛНР у кроликів. Вперше доведено, що при внутрішньорогівковому введенні кЯКККЛ відновлюються функція і структура рогівки, швидше відбуваються реабілітація та регрес запального процесу у тварин із індукцією ЛНР. На експериментальній моделі ЛНР у кролика вперше розроблено метод і визначена доза введення кЯКККЛ.

Практичне значення отриманих результатів. Встановлена ефективність застосування кЯКККЛ для компенсації експериментальної ЛНР є обґрунтуванням можливості використання даного методу лікування в клінічній практиці. Особливості патогенетичного перебігу ЛНР вказують на необхідність використання препаратів імунокоригуючої дії. Завдяки низькій імуногенності та наявності матеріалу в низькотемпературних банках даний метод дозволить своєчасно і в повному обсязі надавати необхідну допомогу пацієнтам із ЛНР.

Особистий внесок здобувача. Спільно з керівником проф., д. м. н. Дьоміним Ю. А. обґрунтовано вибір теми, визначено ідеологію і план виконання роботи. Автором самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, аналіз літератури. Самостійно виконано дослідження впливу кЯКККЛ на модифікацію стану ЛНР у експерименті.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

у роботах (1, 9, 6) – в комплексній оцінці впливу дози кКККЛ та способу введення її в око експериментальних тварин; оцінці ефективності компенсації ЛНР при введенні кЯКККЛ;

у роботах (2, 8) – у розробці експериментальної моделі ЛНР ока кролика;

у роботі (3) – в оцінці патоморфологічних змін в тканині ока кролика при розвитку ЛНР і після введення кЯКККЛ;

у роботі (5) – в оцінці впливу кЯКККЛ на показники крові у кроликів із індукцією ЛНР; проведенні дослідження Т-клітинної ланки імунної системи у кроликів з індукцією ЛНР і після введення кЯКККЛ;

у роботі (4) – у дослідженні характеру змін ІФН- α і ІФН- γ у слъзовій рідині та крові;

у роботі (7) – в оцінці характеру накопичення ростових факторів у тканинах ока тварин після введення кЯКККЛ.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлено та обговорено на наступних наукових форумах: щорічній конференції молодих учених «Холод у біології та медицині» (Харків, 2011, 2015), науковій конференції «Biological and clinical aspects of the use of somatic cells in regenerative medicine» (Вроцлав, Польща).

Публікації.

За результатами дисертації опубліковано 10 наукових праць, із яких 7 статей у провідних фахових виданнях, 3 тези конференцій. Отримано патент на винахід.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», трьох розділів із описом результатів дослідження та їх обговоренням, заключення, висновків, списку використаної літератури, який включає 264 джерела на 28 сторінках. Робота містить 22 таблиці та 50 рисунків. Загальний об'єм роботи складає 147 сторінок, з яких 116 сторінок основного змісту.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Експериментальна робота була проведена на 6-місячних кроликах-самцях породи Шиншила масою 2,0–2,5 кг ($n = 38$; 76 пар очей) відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом із біоетики (Київ, 2013) та узгоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Лабораторні тварини утримувалися в умовах віварію ІПКіК НАН України для експериментальної роботи.

Об'єктом дослідження були кЯКККЛ (70 зразків). Забір біоматеріала здійснювали тільки у жінок із доношеною вагітністю при підписанні з ними інформаної згоди. З цільної ККЛ шляхом пасивної седиментації еритроцитів у градієнті щільності з додаванням «Поліглюкіну» виділяли ядровмісні клітини, які відбирали в стерильні флакони, додавали антикоагулянт СРД (цитратно-фосфатно-декстрозних розчин) із дотриманням правил асептики і антисептики, перед обробкою їх зберігали в побутовому холодильнику при 4°C.

Кріоконсервували ЯКККЛ в одноразових пластикових пробірках за двохетапною програмою на програмному заморозувачі (СКТБ з ДВ ІПКіК НАНУ) у розчині високомолекулярного декстрану «Поліглюкін» («Юрія-Фарм», Україна) за методом (Щуцаєва А.О. та ін., 1998). Зразки зберігали за температури 196°C у низькотемпературному банку ІПКіК НАН України. У день експерименту кЯКККЛ відігрівали в пробірці на водяній бані за температури 40–41°C.

У роботі використовували наступний режим кріоконсервування: охолодження від кімнатної температури до -5°C зі швидкістю 1 град/хв, стабілізація 5 хв, охолодження до -60°C зі швидкістю 2 град/хв і занурення в рідкий азот протягом 45–50 с (до зникнення твердої фази). У частині експериментів використовували такий самий препарат, але з меншою концентрацією декстрану (не більше 0,4%), який при традиційному способі виділення ЯКККЛ залишається в середовищі заморожування в концентрації 3,6% (режим 2) (Бабійчук Л.О., 2010). В обох випадках при кріоконсервуванні ЯКККЛ застосовували двохетапний режим заморожування.

Кількість ЯКККЛ до і після кріоконсервування підраховували в камері Горяєва за загальноприйнятою методикою (Меньшиков В. В., 1987). Збереження клітин визначали експрес-методом за фарбуванням 1%-м розчином трипанового синього. Морфологічний склад ЯКККЧ досліджували до і після кріоконсервування на мазках-відбитках, забарвлених АЗУР-П еозином за Романовським-Гімзою, у світловому мікроскопі («ЛІОМО-2», Росія) у 5 полях зору при $\times 900$ (масляна імерсія), дані представляли у відсотках (Меньшиков В. В., 1987).

Усі тварини залежно від проведених маніпуляцій були розділені на групи: 1 – індукція ЛНР і введення кЯКККЛ; 2 – індукція ЛНР; 3 – індукція ЛНР і введення зруйнованих кип'ятінням кЯКККЛ; 4 – індукція ЛНР і введення фізіологічного розчину; 5 – очі інтактного кроля.

Для обґрунтування застосування кЯКККЛ при лікуванні ЛНР була обрана експериментальна модель, розроблена Є. С. Мілюдіним у нашій модифікації (Мілюдин Е. С. и др., 2006). За нашою модифікацією методики у кролів не вирізали третю повіку, яка виконує захисну функцію і забезпечує зменшення больових відчуттів у тварини при проведенні експериментальної роботи.

У Т-клітинній ланці імунної системи визначали кількісний вміст CD3^+ , CD4^+ , CD8^+ -клітин за допомогою прямої мембранної імуофлуоресценції за методом (Storch V., Emrah I., 1987) на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» («BD», США) з використанням антишурячих ФІТЦ-мічених моноклональних антитілах («BD»). Концентрацію цитокінів ІФН- α , ІФН- γ визначали в сироватці крові та сльозовій рідині імуоферментним методом (ІФА) на тест-системах (ТОВ «Цитокін», Росія) згідно з інструкцією виробника. Результати реєстрували при довжині хвилі 450 нм і виражали в пг/мл. Забір сльози у кроликів здійснювали за допомогою диска фільтрувального паперу діаметром 5 мм, який на 5 хв поміщали в нижнє склепіння кон'юнктивального мішка. Компоненти сльози елюювали фізіологічним розчином, центрифугували для відділення нерозчинних компонентів. Надосадову рідину використовували для дослідження.

Для визначення концентрації ростового фактора TGF-1b використовували високочутливу тест-систему виробництва «DRG» (США)

із чутливістю 2 пг/мл, для вимірювання BDNF – тест-систему «R & D Systems» Quantikine (США) із чутливістю 20 пг/мл. Усі вимірювання проводили згідно з інструкцією виробника методом ІФА та при використанні напівавтоматичного спектрофотометра для 96-лункових планшетів «StatFax 2400» (США) із вертикальним променем.

Аналіз клінічних показників виконували методом фокального освітлення, огляд рогівки ока за допомогою щілинної лампи («Topcon SL-D7», Японія). Мікрофотографію цитологічних і гістологічних препаратів здійснювали в світловому мікроскопі «Primo Star» («Carl Zeiss», Німеччина) цифровою камерою «Power Shot A 640» (Японія).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за методом Стюдента-Фішера (Ашмарин І. П., 1962) за допомогою програми «Statistica 7.0» («Stat Soft Inc.», США), адаптованої до поставлених завдань і специфіки даних.

Результати дослідження та їх аналіз

Встановлено, що після кріоконсервування кількість кЯКККЛ у суспензії значуще не змінилася порівняно з вихідними зразками та залишалася на високому рівні: $(1,35 \pm 0,38) \times 10^9$ (86,0%) і $(1,5 \pm 0,32) \times 10^9$ (97,0%) відповідно. До кріоконсервування в суспензії ЯКККЛ в основному визначалися лімфоцити, в невеликій кількості – нейтрофіли, моноцити і недиференційовані клітини. Відразу після відігрівання в кЯКККЛ також переважали лімфоцити, значуще збільшилася відносна кількість недиференційованих клітин; значуще зменшилася відносна кількість нейтрофілів. Кількість колонієтворюючих одиниць клітин після кріоконсервування значуще не змінилася і становила 2,5 і 2,7 од. відповідно.

Розробка експериментальної моделі ЛНР. Для експерименту були відібрані кролики з однаковим діаметром рогівки (10 мм), товщина рогівки в центрі та по периферії в середньому становила (420 ± 15) мкн (0,042 см). Перед нанесенням мітоміцину С (ММС) виконували протягом 20 с аплікацію на рогівку диска фільтрувального паперу діаметром 10 мм, просоченого 10%-м розчином етилового спирту. Потім за допомогою мікротупфера видаляли некротизовані епітеліальні клітини рогівки під контролем 1%-го розчину флуоресцеїну. Вміст флакона ММС (2 мг) розчиняли в 5 мл дистильованої води (кінцева концентрація 0,04 %). Наносили розчин ММС (7 мкл) на аплікатор із фільтрувального паперу (діаметр 10 мм). Перед експонуванням на рогівку ока. Аплікатор на рогівку ока експонували з різними інтервалами часу: 30 с, 1, 2, 3, 4, 5 хв, а один із аплікаторів зберігали без експонування. Усі аплікатори поміщали в віалки об'ємом 20 мл по одному в кожену, додавали по 2 мл метилового спирту, герметично закривали гумовою пробкою і поміщали в ультразвукову баню на 5 хв. Методом рідинної хроматографії із застосуванням діодноматричної детекції визначали концентрацію ММС у зразках. Для розділення фаз використовували колонку з

октадецилсилільною прищепленою фазою. Довжина хвилі з максимумом поглинання ММС складала 360 нм, що забезпечувало достатньо високу селективність сигналу в поєднанні з низьким порогом його виявлення в пробах. Проби елюювали в градієнтному режимі для двох фаз: ацетонітрилу і фосфатного буфера (рН 3,0) з концентрацією іонопарної домішки – гептансульфонату натрію (0,01 М). Об'єм ММС обчислювали за стандартною формулою: $V = 2\pi R$.

Час виведення ММС із рогівки визначали за формулою: $t = V / v$.

Швидкість дифузії (v) складала $1,99764E-05$ г/хв, що дорівнює $19,97635$ мкг/хв.

$t = 2\pi R / v = 2 \times 3,14 \times 0,021 / 1,99764E-05 = 26,2$ години.

Одержаний результат визначив можливість застосування кЯКККЛ для лікування ЛНР.

Вплив дози і способу введення кЯКККЛ в око кролика з індукцією ЛНР. Нами був обраний найбільш патогенетично обґрунтований спосіб введення кЯКККЛ, який дозволяє доставляти клітини безпосередньо в строму рогівки. Даний спосіб введення медичних препаратів застосовують при лікуванні важких хронічних запальних процесів та виразок рогівки. Введення кЯКККЛ проводили під збільшувальною лупою інсуліновим шприцем у кожний з восьми основних меридіанів зони лімба. Для відпрацювання дози кЯКККЛ усі кролики були розділені на чотири групи, по шість тварин у кожній. Тваринам кожної групи в одне око вводили по 0,5 мл кЯКККЛ в різній дозі: 1 – $0,3 \times 10^6$; 2 – $0,5 \times 10^6$; 3 – 1×10^6 клітин, у друге – фізіологічний розчин у тому ж об'ємі. Аналіз проводили на 7-у добу після введення кЯКККЛ.

У групі 1 відзначали формування стійкого помутніння рогівки, процеси регенерації мали уповільнений характер. У групі 2 спостерігали лікувальний ефект із найкращим протіканням репаративних процесів у рогівці, відновлення поверхневого шару епітелію рогівки вже на 7-у добу. У групі 3 відзначали набряк рогівки і реактивне запалення оболонки очного яблука, регенеративні процеси протікали в'яло. На підставі отриманих результатів дослідження для лікування ЛНР була обрана доза $0,5 \times 10^6$ клітин у 0,5 мл.

Стан Т-клітинної ланки імунітету у кроликів із індукцією ЛНР і після лікування. В результаті проведених досліджень було встановлено, що вже на 3-ю добу після індукції ЛНР у тварин була порушена Т-клітинна ланка імунітету. Імунна система у кроликів групи 2, як і групи 4 на 3-ю добу характеризувалася стійким зниженням кількості загальних Т-лімфоцитів ($CD3^+$), яке до 14-ї доби було значуще нижче від контрольних значень ($p < 0,05$) (рис. 1, а). Показник Т-регуляторних клітин мав таку ж тенденцію. Вміст Т-хелперів ($CD4^+$) у крові кроликів із індукцією ЛНР значуще знижувався на 1-у добу і незначно підвищувався на 7-у добу, залишаючись на 14-у добу значуще нижче від контролю ($p < 0,05$) (рис. 1, б). На 1-у добу розвитку запального процесу відзначалося стійке

пригнічення Т-супресорів/цитотоксичних ($CD8^+$), їх активацію не спостерігали навіть на 14-у добу. Субпопуляції регуляторних Т-хелперів ($CD4^+$) і Т-супресорів/цитотоксичних ($CD8^+$), як компонент загальної фракції Т-лімфоцитів, змінювалися в ході розвитку ЛНР (рис. 1, в). Це знайшло своє відображення в різкому збільшенні імунорегуляторного індексу, який вже на 3-ю добу значуще ($p < 0,05$) перевищував контроль і був підвищеним і на 7-у добу. Імунорегуляторний індекс не повертався до норми і на 14-у добу (рис. 1, г). Лікування ЛНР у тварин введенням кЯКККЛ мало перевагу: покращення показників загальних Т-лімфоцитів, субпопуляції регуляторних Т-хелперів і Т-супресорів/цитотоксичних; наближення до контролю в усі терміни вивчення імунорегуляторного індексу. В групі тварин, яким застосовували для лікування зруйновані кЯКККЛ, такого ефекту не спостерігали.

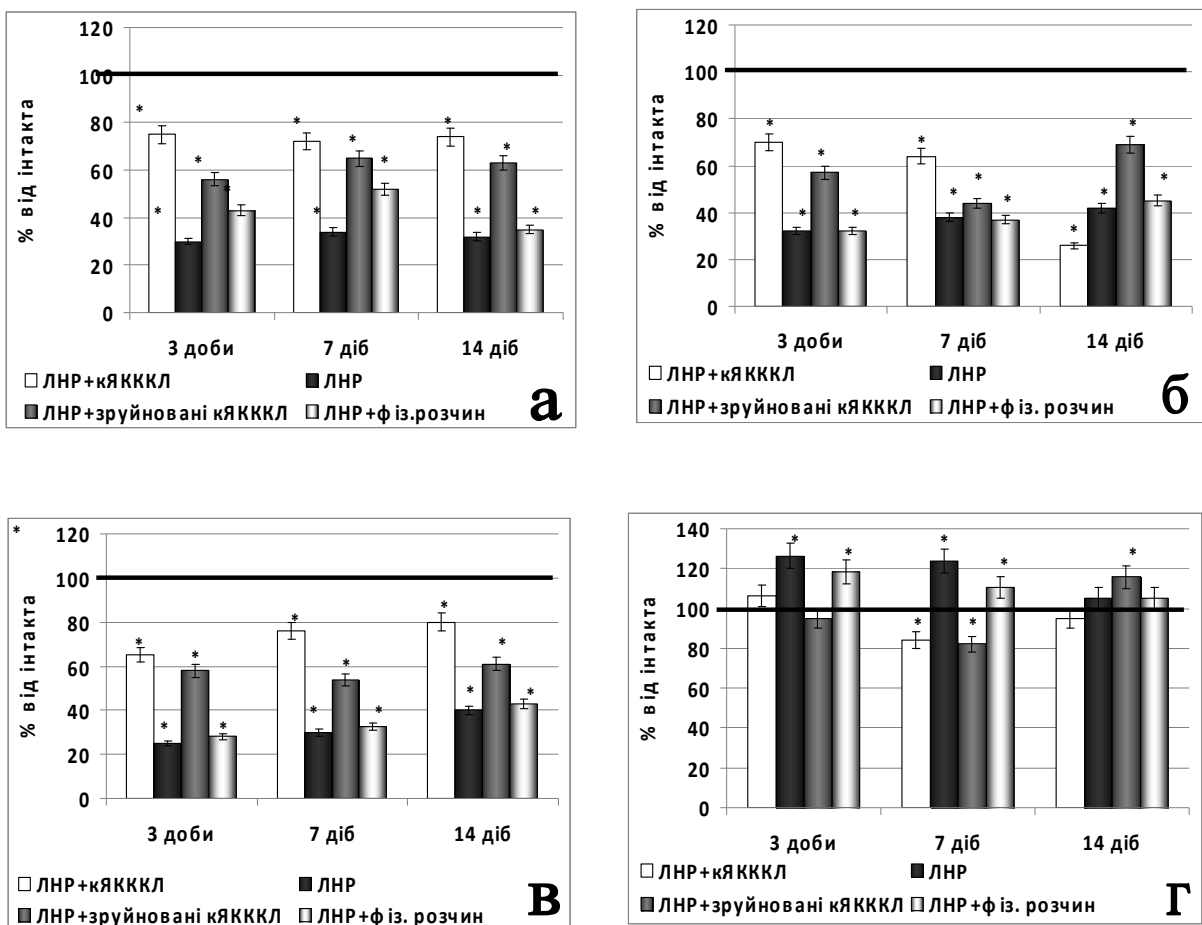


Рис. 1. Вміст загальних Т-лімфоцитів (а), Т-хелперів (б), Т-супресорів/цитотоксичних (в) та імунорегуляторний індекс (г) у крові кроликів із індукцією ЛНР до і після лікування.

Характер зміни цитокінів ІФН- α і ІФН- γ у сльозовій рідині та сироватці крові у тварин із індукцією ЛНР і після лікування. У результаті проведених досліджень було показано, що у сльозовій рідині інтактних тварин присутні в незначній концентрації ІФН- α і ІФН- γ . При

цьому вміст ІФН- γ в слюзовій рідині у здорових тварин був вище, ніж вміст ІФН- α , на відміну від сироватки крові. При індукції ЛНР рівень ІФН- α у крові був нижче рівня норми в 2,3 рази, а в слюзовій рідині – в 2 рази. Показники ІФН- γ в слюзі на відміну від крові тварин з ЛНР були вищими, ніж ІФН- α . У крові та слюзовій рідині всіх тварин, яких лікували введенням кЯКККЛ, на тлі терапії показник ІФН- α вже до 7-ї доби практично досягав норми. У кролів, яким вводили зруйновані клітини кЯКККЛ, на 7-у добу відзначали підвищення вмісту ІФН- α , цей показник був вище, ніж у тварин із введенням зруйнованих кЯКККЛ. У кроликів, яким вводили фізіологічний розчин, концентрація ІФН- α як у слюзовій рідині, так і в крові, у порівнянні з контролем, до 14-ї доби була зниженою (рис. 2, а, б). При дослідженні вмісту ІФН- γ у слюзовій рідині та в крові тварин, яких лікували кЯКККЛ, на 7-у добу спостерігали значуще його підвищення, а на 14-у добу – його відновлення (рис. 2, в, г). На 14-у добу значущих відмінностей у концентрації ІФН- α і ІФН- γ у слюзовій рідині та сироватці крові у кроликів порівняно з інтактними тваринами виявлено не було.

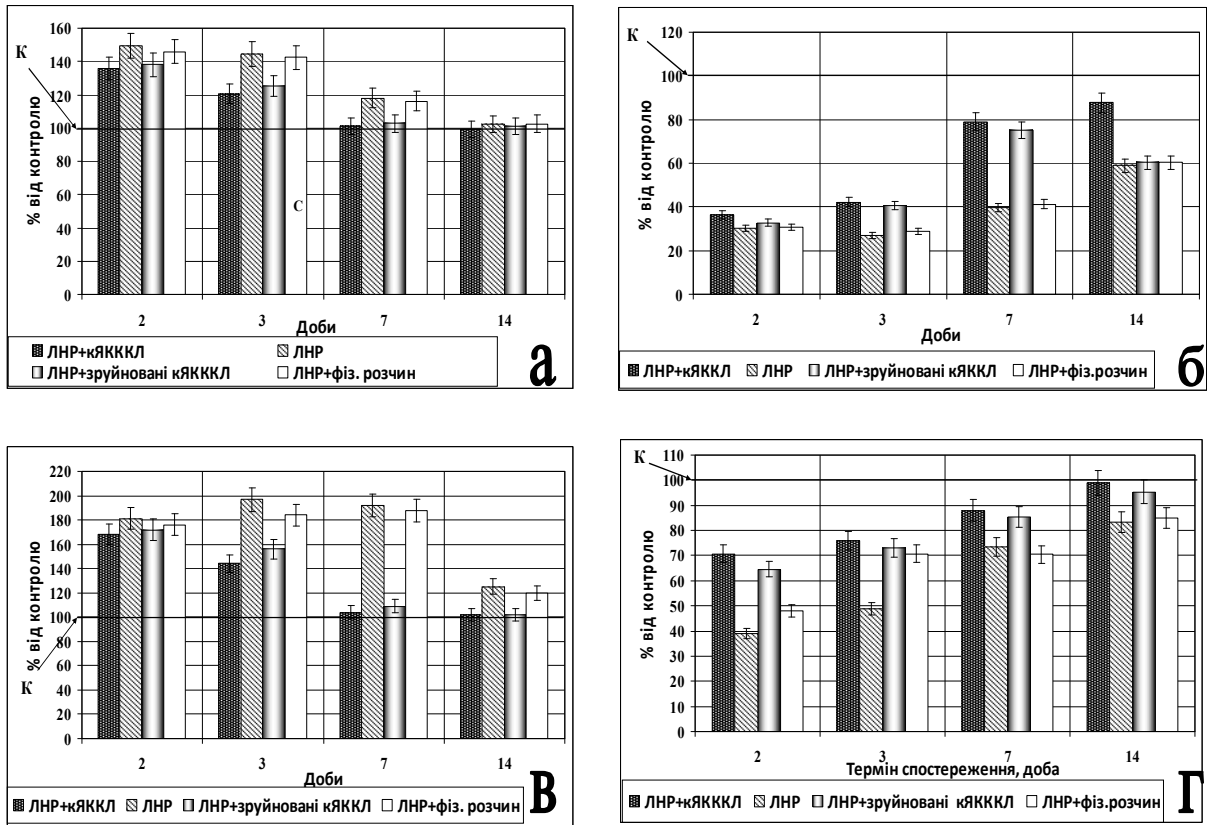


Рис. 2. Динаміка показників концентрації ІФН- γ (а) та ІФН- α (в) у слюзі та сироватці крові (б, г) кроликів із ЛНР і після лікування.

Клінічна оцінка ефективності застосування кЯКККЛ у лікуванні ЛНР. При клінічному дослідженні переднього відрізка ока у кроликів, яких лікували кЯКККЛ, будь-яких ознак специфічної токсично-алергічної

реакції на їхнє введення (дерматит повік, хемоз, алергічні інфільтрати в лімбі, перилімбально або в рогівці) виявлено не було. На 3-ю добу в рогівці ока кроликів із індукцією ЛНР, а також після лікування введенням фізіологічного розчину або зруйнованих кЯКККЛ спостерігали однаково виражену запальну реакцію, яка була оцінена 2 балами. Візуально відзначали слизове виділення, змішану ін'єкцію кон'юнктиви, перифокальний набряк рогівки. Діаметр епітеліального дефекту в цих групах був однаковим і становив у середньому $(6,4 \pm 0,4)$ мм. У тварин, яких лікували введенням кЯКККЛ, рогівка зберігала прозорість і запальна реакція не виявлялася. На 7-у добу клінічна картина у тварин була різною і залежала від виду лікування. Запальна реакція у тварин, яких лікували фізіологічним розчином або зруйнованими кЯКККЛ, була оцінена 1–2 балами, а у кроликів із введенням кЯКККЛ цей показник відповідав 1 балу. На 7-у добу почало відбуватися помутніння рогівки. Стійке її помутніння сформувалося в цей період у тварин із патологією та після лікування фізіологічним розчином. У кроликів із введенням кЯКККЛ у здорове око рогівка була прозорою, запальної реакції не спостерігалось. На 14-у добу після індукції ЛНР і лікування введенням кЯКККЛ або зруйнованих клітин запальна реакція у всіх тварин оцінювалася в 0 балів: у цих кроликів рогівка зберігала прозорість, запальна реакція була відсутня. Однак найкращі результати спостерігались у тварин, яких лікували введенням кЯКККЛ.

Отримані дані клінічного дослідження корелювали з показниками клінічного аналізу крові у кроликів при розвитку ЛНР і після лікування. Так, у тварин із індукцією патології та після лікування фізіологічним розчином на 3-ю добу спостерігали лейкоцитоз зі зсувом вліво. У тварин, яких лікували кЯКККЛ, позитивна динаміка зниження кількості лейкоцитів у крові була відзначена вже на 3-ю добу, до 7-ї доби їх кількість незначно знизилася, а на 14-у добу практично відповідала нормі.

Зміни в клітинному складі крові у кроликів із індукцією ЛНР виявлялися в значному зниженні кількості лімфоцитів ($p < 0,05$). На тлі проведеної терапії кЯКККЛ із 3-ї доби відзначали відновлення показників крові.

На всіх термінах спостереження кількість еритроцитів і вміст гемоглобіну у тварин із індукцією ЛНР були зниженими. На 3-ю добу після введення кЯКККЛ спостерігалось підвищення цих показників. Варто зазначити, що на 7-у добу вони були нижчими від норми, однак вищими, ніж в інших групах. На 14-у добу кількість еритроцитів і гемоглобіну значуще ($p > 0,05$) відповідала нормі.

Показник швидкості осідання еритроцитів у всіх нелікованих тварин знаходився на однаковому рівні та відрізнявся від контрольного на відміну від інших показників крові. Виняток становили кролики, яких лікували фізіологічним розчином: даний показник перевищував вихідні величини на всіх термінах спостереження.

Патоморфологічні зміни ока кролика при розвитку ЛНР і після введення КЯКККЛ. На гістологічних препаратах рогівки тварин із індукцією ЛНР на 3-ю добу спостерігали майже повний (близько 80%) дефект переднього епітелію. По периферії рогівки, ближче до лімба, в передньому шарі епітелію було помітно більшу кількість шарів клітин, ніж у центральній частині. Оскільки клітини морфологічно відрізнялися між собою, то неможливо було виділити шар переднього епітелію.

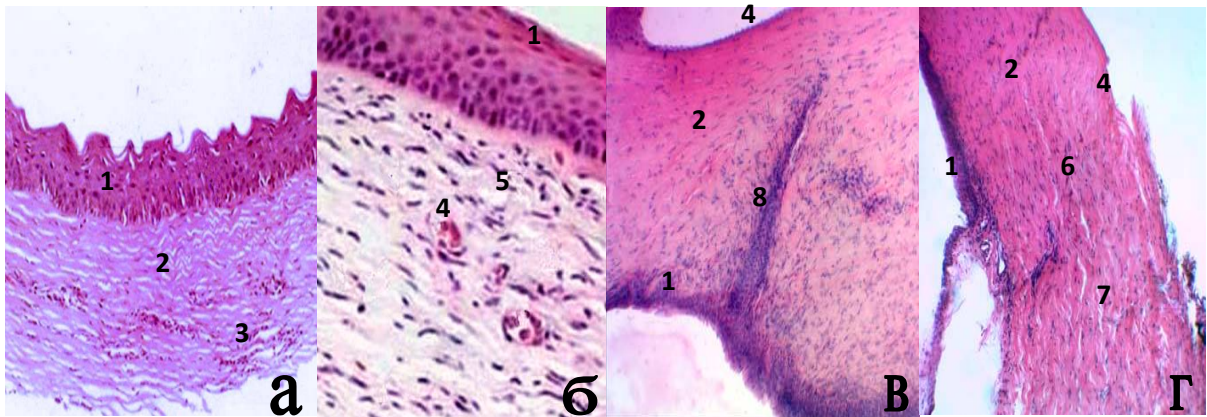


Рис. 3. Рогівка кролика на 7-у (а, б) добу індукції ЛНР та після введення КЯКККЛ на 3-у (в) та 7-у добу (г). Забарвлення гематоксилином і еозином; x100 (а, в), x400 (б), x200 (г): 1 – передній шар епітелію; 2 – власне речовина (строма); 3 – задній шар епітелію (ендотелій); 4 – новоутворені судини; 5 – кератоцити; 6 – лімба; 7 – склера; 8 – місце введення КЯКККЛ.

У стромі рогівки було виявлено значний набряк, внаслідок якого відбулося розшарування колагенових волокон, і між ними виникли щілини. Кератоцити мали витягнуту форму та гіперхромні ядра. З нижнім краєм строми рогівки межувала десцеметова оболонка, яка була представлена шаром щільнорозташованих колагенових волокон. Контур ендотелію був нерівний, хвилястий.

На 7-у добу дослідження в рогівці тварин спостерігали епітелізацію. Передній епітелій мав у ній різну товщину: по периферії більше, ніж у центрі. Епітелій багат шаровий, але виявлялися порушення впорядкованого розташування клітин та келихоподібні клітини, характерні для епітелію кон'юнктиви. По периферії епітелій кон'юнктиви наростав у вигляді валу на поверхні рогівки. Зменшився набряк строми рогівки, відзначалося значне зменшення кількості сегментоядерних лейкоцитів у поверхневих шарах власної речовини рогівки. У стромі рогівки були помітні поодинокі судини. Ендотеліюцити мали сплюснені базофільні ядра та злегка набряклу еозинофільну цитоплазму. Периваскулярно були помітні поодинокі лімфоцити. З нижнім краєм строми рогівки межувала змінена десцеметова оболонка (рис. 3, а, б).

На 14-у добу дослідження в рогівці ока тварин із індукцією ЛНР спостерігали повну епітелізацію. Визначалися багат шаровий епітелій, який створював нерівну поверхню рогівки, та поява келихоподібних клітин, характерних для епітелію кон'юнктиви, який наростав на поверхні рогівки по периферії. Волокнисті компоненти строми рогівки мали рихлу структуру, що сприяло проростанню судин із зони лімба в парацентральної ділянки, переважно в передній третині рогівки.

На гістологічних препаратах рогівки у тварин із індукцією ЛНР, яких лікували введенням кЯКККЛ, на 3-ю добу спостерігали епітелізацію. На всій поверхні рогівки товщина переднього епітелію була нерівномірною. Клітини базального шару мали значне ядро-цитоплазматичне співвідношення, спостерігалася значна кількість ділянок мітозів.

При дослідженні виявлена міграція клітин від периферії до центру рогівки і заміщення ними епітеліального дефекту. В зоні лімба було помітне місце введення кріоконсервованих клітин кордової крові у вигляді тяжа, зануреного в строму рогівки (рис. 3, в). У стромі рогівки спостерігали незначний набряк. Десцеметова оболонка визначалася у вигляді безперервної пластинки. З внутрішньої сторони до неї прилягав шар плоских клітин ендотелію з овальними базофільними ядрами.

На 7-у добу спостереження рогівка експериментальних тварин була покрита диференційованим багат шаровим плоским незроговілим епітелієм. У стромі спостерігали пучки колагенових волокон, розташованих впорядковано, паралельно до поверхні рогівки. Інфільтрація строми рогівки сегментоядерними лейкоцитами не відзначалася. У зоні лімба в субепітеліальних відділах рогівки спостерігали клітини з базофільними ядрами неправильної або дещо витягнутої форми, які займали більшу частину цитоплазми (рис. 3, г).

На 14-у добу спостерігали епітелізацію рогівки, представлену 2–3 шарами епітеліоцитів. Відзначали значне збільшення кількості фібробластів на одиницю площі в центральній оптичній області рогівки. Ендотелій був утворений одним шаром плоских клітин із овальними базофільними ядрами і мав рівний контур.

Характер накопичення ростових факторів у тканинах ока кроликів після введення кЯКККЛ. Після введення в зону лімба кЯКККЛ у тканині рогівки кролів групи 2 (режим 1) і 3 (режим 2) спостерігалася збільшення вмісту ростових факторів BDNF, TGF-1b порівняно з інтактним контролем (група 1). До 21-ї доби від моменту введення в рогівку кЯКККЛ концентрація BDNF в порівнянні з контрольною групою збільшилася в 3 рази, а для TGF-1b – в 4 рази. Кількість біологічно активних речовин, які виявляються в зоні лімба в термін до 21-ї доби від моменту введення, підвищується зі збільшенням часу перебування кЯКККЛ у рогівці кроликів. Незалежно від режиму заморожування на 21-у добу концентрація ростових факторів BDNF, TGF-1b була істотно вищою, ніж у тварин із розвитком ЛНР без лікування (рис. 4, а, б).

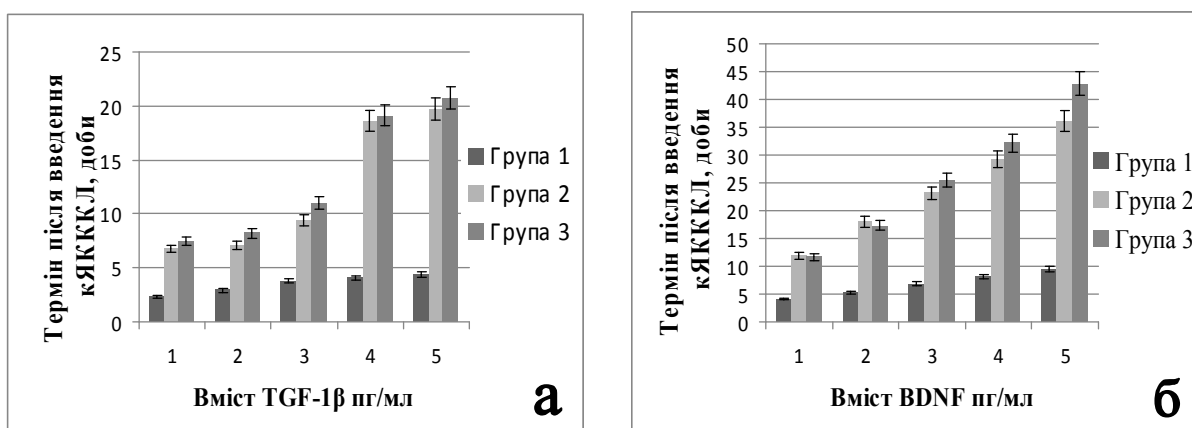


Рис. 4. Динаміка накопичення TGF-1 β (а) і BDNF (б) у рогівці у кроликів із індукцією ЛНР і після введення кЯКККЛ, заморожених за режимом 1 (група 1) і за режимом 2 (група 2).

ВИСНОВКИ

На підставі комплексного дослідження наведено теоретичне узагальнення та вирішення наукової задачі, яке полягає у визначенні впливу введення кЯКККЛ для відновлення структурно-функціонального статусу і корекції ЛНР.

1. Встановлено, що кріоконсервування ЯКККЛ забезпечує високий рівень їх збереження. Кількість кЯКККЛ у суспензії значуще не змінилася порівняно з вихідними зразками та залишалася на високому рівні: $(1,35 \pm 0,38) \times 10^9$ (86,0%) і $(1,5 \pm 0,32) \times 10^9$ (97,0%) відповідно. Це підтверджується оцінкою їх структурної організації, а також функціональною активністю в умовах *in vitro* та *in vivo*.

2. Модифікована експериментальна модель ЛНР. Розроблено спосіб введення кЯКККЛ (внутрішньорогівкового) і оптимальну дозу ($0,5 \times 10^6$ клітин у 0,5 мл).

3. Проведені результати імунологічного дослідження стану Т-клітинної ланки імунної системи у кроликів із індукцією ЛНР дозволили рекомендувати кЯКККЛ як імунокоректор. Імунорегуляторний індекс був збільшений вже на 3-ю добу ($p < 0,05$), перевищував контроль і був підвищеним як на 7-у добу, так і на 14-у добу.

4. Показана здатність кЯКККЛ нормалізувати показники цитокінів у сироватці крові та слюзовій рідині у тварин із індукцією ЛНР: зниження вмісту ІФН- α і підвищення ІФН- γ . У крові та слюзовій рідині всіх тварин, яких лікували введенням кЯКККЛ, на тлі терапії показник ІФН- α вже до 7-ї доби практично досягав норми. При дослідженні вмісту ІФН- γ на 7-у добу спостерігали значуще його підвищення, а на 14-у добу – його відновлення.

5. Встановлено, що введення кЯКККЛ є важливим компонентом у корекції показників периферичної крові при лікуванні ЛНР в умовах експерименту. Спостерігається практично повна нормалізація показників вже на 7-у добу.

6. Доведено, що підвищення секреції ростових факторів (BDNF в порівнянні з контрольною групою збільшилася в 3 рази, а для TGF-1b – в 4 рази) після введення кЯКККЛ кроликам в експериментальній моделі ЛНР прискорює процеси регенерації клітин лімба, епітелію та строми рогівки.

7. Обґрунтовано, що у середовищі з меншим вмістом декстрану (3,6%) кЯКККЛ в рівній мірі володіють терапевтичною ефективністю.

8. Застосування кЯКККЛ як препарату терапії ЛНР сприяло відновленню зорових функцій та структури рогівки. Отримані результати експериментального дослідження дозволяють рекомендувати для використання кЯКККЛ при лікуванні ЛНР у клінічній практиці.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Свидко Е. Н. Клиническое обоснование применения криоконсервированных клеток кордовой крови при индукции экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы / [Е. Н. Свидко, Ю. А. Дёмин] // Проблемы екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2013. – Т. 5 №118. – С. 39–44.

2. Свидко Е. Н. Морфологическое подтверждение экспериментальной модели лимбальной клеточной недостаточности / [Е. Н. Свидко, Ю. А. Дёмин] // Проблемы екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2013. – Вип. 2 (116). – С. 41–49.

3. Свидко К. М. Морфологічні особливості репаративних процесів у рогівці кролів при введенні криоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові на тлі експериментальної лімбальної недостатності / [К. М. Свидко, Ю. А. Дьомін] // Світ медицини та біології. – 2013. – Вип. 3. – С. 41–44.

4. Свидко Е. Н. Интерфероновый статус и эффективность применения криоконсервированной кордовой крови в лечении повреждения роговицы / [Е. Н. Свидко, П. А. Борисов, М. В. Останков, Н. А. Бондарович, Ю. А. Дёмин] // Медицина сегодня и завтра. – 2014. – Вип. 4. – С. 24–30.

5. Свидко Е. Н. Состояние Т-клеточного иммунитета у кроликов с индукцией лимбальной недостаточности роговицы / [Е. Н. Свидко, М. В. Останков, Т. Г. Дубрава, Н. А. Бондарович, Ю. А. Дёмин] // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2014. – Т. 4 № 65. – С. 79–85.

6. Свидко Е. Н. Влияние криоконсервированной кордовой крови на показатели крови кроля при лимбальной недостаточности роговицы / [Е. Н. Свидко, Н. А. Бондарович, М. В. Останков, Ю. А. Дёмин, А. Н. Гольцев] // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2014. – Т. 1, №62. – С. 36–44.

7. Свидко Е. Н., Рязанцев В. В., Бабийчук Л. А., Дёмин Ю. А. Характер накопления ростовых факторов в тканях глаза после введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови (кЯКККЛ) // <http://research-journal.org/>: Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. URL: <http://research-journal.org/?p=11898>.

8. Свидко Е. Н. Экспериментальная модель лимбальной недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия для исследования действия криоконсервированных клеток крови / [Е. Н. Свидко, Ю. А. Дёмин] // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №2. – С. 226.

9. Svidko K. M. Clinical and pathomorphological substantiation of application of cryopreserved blood cells to compensate corneal limbal deficiency / [K. M. Svidko, Yu. A. Demin] // Biological and clinical aspects of the use of somatic cells in regenerative medicine. – 2013. – p. 41.

10. Свидко Е. Н. Компенсация лимбальной недостаточности роговицы ядродержащими клетками кордовой крови / [Е. Н. Свидко, Ю. А. Дёмин] // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №2. – С. 181.

АНОТАЦІЯ

Свідко К. М. Компенсація лімбальної недостатності рогівки криоконсервованими ядромісними клітинами кордової крові людини. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – криомедицина. Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, Харків, 2015.

Дисертаційна робота присвячена вивченню можливості застосування та дослідженню механізму дії криоконсервованих ядромісних клітин кордової крові людини (кЯКККЛ) в експериментальній моделі лімбальної недостатності рогівки (ЛНР).

Було розроблено модель для дослідження ефективності кЯКККЛ і метод, встановлено дозу їх введення. Доведено, що криоконсервування забезпечує високий рівень збереження ЯКККЛ, що підтверджується оцінкою структурної організації, а також функціональної активності клітин в умовах *in vitro* та *in vivo*.

У роботі отримано експериментальні дані, які свідчать про нормалізацію рівня цитокінів у крові та сльозі, показників Т-клітинної ланки імунітету та периферійної крові, клінічний перебіг ЛНР після введення кЯКККЛ.

Встановлено, що підвищення секреції ростових факторів (BDNF і TGF-1b) після введення кЯКККЛ кроликам в експериментальній моделі ЛНР сприяло процесу регенерації клітин лімба, епітелію і строми рогівки. Показано, що застосування ЯКККЛ, криоконсервованих у середовищі з меншим вмістом декстрану, має однакову терапевтичну ефективність. Застосування кЯКККЛ як препарату терапії ЛНР сприяло відновленню зорових функцій. Отримані результати експериментального дослідження

дозволяють рекомендувати кріоконсервовані ЯКККЛ при лікуванні ЛНР у клінічній практиці.

Ключові слова: кріоконсервування, ядровмісні клітини, кров, лімбальна недостатність рогівки, ростові фактори.

АННОТАЦИЯ

Свидко Е. Н. Компенсация лимбальной недостаточности роговицы кріоконсервированными ядродержащими клетками кордовой крови человека. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.35 – криомедицина. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2015.

Диссертационная работа посвящена изучению возможности использования и расшифровки механизма действия кріоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека (кЯКККЧ) при индукции лимбальной недостаточности роговицы (ЛНР). В работе проведено исследование влияния кріоконсервирования на характеристики клеточных популяций ККЧ, которые потенциально могут обеспечить терапевтический эффект при лечении ЛНР; разработана адекватная экспериментальная модель ЛНР глаза кролика; проведена комплексная оценка влияния дозы кЯКККЧ и разработан метод введения ее в глаз экспериментальных животных; дана оценка патоморфологических изменений в глазах кролика при развитии ЛНР и после лечения кЯКККЧ, характера накопления ростовых факторов в тканях глаза после введения кЯКККЧ, клинической эффективности компенсации ЛНР при введении кЯКККЧ, а также влиянию кЯКККЧ на показатели крови у кроликов с индукцией ЛНР; исследован характер изменений цитокинов ИФН- α и ИФН- γ в слезной жидкости и сыворотке крови; проведено исследование иммунной системы у кроликов с индукцией ЛНР и после лечения кЯКККЧ.

Комплексные исследования ИФН- α и ИФН- γ в слезной жидкости и сыворотке крови при индукции ЛНР выявили снижение содержания α - и γ -интерферона. Коррекции измененных показателей Т-клеточного звена иммунной системы способствуют кЯКККЧ, которые развиваются при ЛНР как в глазу, так и организме в целом.

В работе показано, что кЯКККЧ является важным компонентом для коррекции показателей периферической крови при лечении ЛНР в условиях эксперимента. Уже с первых суток после введения кЯКККЧ обеспечивают цитопротекцию и регенерацию клеток роговицы и лимба, в независимости от режима кріоконсервирования, сохраняют свою целостность и после введения в орган зрения имеют нарастающий характер наработки факторов роста (BDNF, TGF-1b), концентрация которых постепенно нарастает с 1- по 21-х сутки исследования. Традиционным криопротектором для использования является ДМСО, в

данном случае с неизбежной примесью декстрана (в виде фармпрепарата «Полиглюкин»), который остается в среде криоконсервирования. Однако известно, что декстран имеет некоторые отрицательные качества. Доказано, что ККЧ, криоконсервированные в среде с меньшим содержанием декстрана, имели такую же терапевтический эффект. Повышение секреции ростовых факторов (BDNF и TGF-1b) после введения кЯКККЧ животным в экспериментальной модели ЛНР ускоряют процессы регенерации клеток лимба, эпителия и стромы роговицы. Разработанный новый метод введения кЯКККЧ путем инфильтрации роговицы, а также выявленная оптимальная доза введения препарата в роговицу животного, которая позволяет выполнять эту процедуру без специальных хирургических навыков.

Полученные результаты экспериментального исследования позволяют рекомендовать применение кЯКККЧ в широкой офтальмологической практике при лечении ЛНР.

Ключевые слова: криоконсервирование, ядросодержащие клетки, кровь, лимбальная недостаточность, ростовые факторы.

Annotation

Svidko K.M. Compensation of limbal stem cell deficiency with cryopreserved cord blood nucleated cells. – Manuscript.

The dissertation for the candidate of medical sciences degree (PhD equivalent) in specialty 14.01.35. – cryomedicine. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2015.

The thesis is devoted to studying the possible use and investigation of the action mechanism of cryopreserved cord blood nucleated cells (cCBNCs) in an experimental model of corneal limbal deficiency (CLD).

There were developed the model to study the efficiency of cCBNCs as well as the method, the dose of their administration was found. Cryopreservation has been proven to provide a high level of cCBNCs preservation, as evidenced by the assessment of structural organization and functional activity of the cells *in vitro* and *in vivo*.

There were obtained experimental data demonstrating the normalization of the level of cytokines in blood and tear, the indices of T-cell immunity link and peripheral blood, clinical course of CLD after cCBNCs administering.

An increased secretion of growth factors (BDNF and TGF-1b) after administration of cCBNCs to the rabbits in experimental model of CLD has been established to contribute to the regeneration of the cells of limb, epithelium and stroma of the cornea. It has been shown that the application of cCBNCs, cryopreserved in the medium with lower content of dextran, has the same therapeutic efficiency. The use of cCBNCs as the therapeutic drug for CLD ensured the recovery of visual function. The results of experimental

researches allow the recommending of cryopreserved cCBNCs to treat the CLD in clinics.

Keywords: cryopreservation, nucleated cells, blood, limbal deficiency, growth factors, peripheral blood.

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ:

BDNF – нейротрофічний фактор мозку

TGF- β 1 – трансформуючий фактор росту β 1

ІФН- α – інтерферон альфа

ІФН- γ – інтерферон гамма

кЯКККЛ – кріоконсервовані ядровмісні клітини кордової крові людини

ККЛ – кордова кров людини

ЛНР – лімбальна недостатність рогівки