

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

БАБІЙЧУК ЛЮДМИЛА ВІКТОРІВНА

УДК 616.12-008.331.1-092.4: 612.649.011.87: 615.014.41

**ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ КОРДОВОЇ КРОВІ НА СТРУКТУРНО-
ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ У ТВАРИН
ІЗ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ**

(експериментальне дослідження)

14.01.35 – кріомедицина

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Харків – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор
Коваль Сергій Миколайович,
ДУ «Національний інститут терапії
ім. Л.Т. Малої НАМН України», м. Харків
завідувач відділення артеріальної гіпертензії.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор
Сосін Іван Кузьмич,
Харківська медична академія післядипломної
освіти МОЗ України,
завідувач кафедри наркології;

доктор медичних наук, професор
Шепітько Володимир Іванович,
ВДНЗ України «Українська медична
стоматологічна академія» МОЗ України, м. Полтава
завідувач кафедри гістології, цитології
та ембріології.

Захист відбудеться «20» березня 2018 р. о 13:30 годині на
засіданні спеціалізованої Вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем
кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою:
61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «12» лютого 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. На даний час для вирішення ряду важливих медико-біологічних задач широко застосовуються кріотехнології, на основі яких розроблено унікальні методи довгострокового зберігання в низькотемпературних банках клітин, тканин та інших біологічних об'єктів зі збереженням їх життєздатності і функціональної повноцінності. У регенеративній медицині для відновлення функцій органів і тканин використовуються кріоконсервовані клітинні препарати плацентарного походження. Завдяки низькій імуногенності і високому регенеративному потенціалу, а також наявності в їх складі стовбурових клітин вони є унікальним матеріалом для клітинної терапії (Грищенко В.І., 1988 – 2010; Гольцев А.М., 1998–2016; Прокопюк О.С. та ін., 2011; Бабійчук Л.О., 2009). Особливий інтерес представляє кордова кров (КК) та її компоненти, які являють собою унікальну субстанцію з різноспрямованою біологічною активністю. Відмінною особливістю КК є те, що вона багата на стовбурові гемопоетичні клітини-попередники (ГСК). Застосування КК ефективно для лікування ряду захворювань, у патогенезі яких провідну роль відіграє зниження компенсаторно-захисних механізмів організму (Mayani Н., 2010; Gluckman Е., 2009; Смолянінов А.Б., 2009; Broxmeyer Н.Е., 2011). У науковій і клінічній практиці накопичено значну інформацію щодо позитивного впливу КК як на різні органи, системи, так і на організм у цілому (Куртова А.В. та ін., 2006; Кочегура Т.Н., 2009; Глюкман Є.Д., 2011). Встановлені плюріпотентність і висока пластичність, дозволили розглядати гемопоетичні стовбурових клітин кордової крові (ГСК КК), як потенційне джерело для клітинної терапії широкого спектра захворювань, у тому числі й кардіологічних.

На даний час есенціальна артеріальна гіпертензія (АГ) відноситься до найбільш поширених захворювань серцево-судинної системи (ССС) (Коваленко В.М., 2008; Сіренко Ю.М., 2014). Вона є однією з найбільш поширених причин інвалідизації та скорочення тривалості життя людей працездатного віку (Мала Л.Т., 2002; Коваль С.М., 2008; Беленков Ю.М., 2012; Колесник М.Ю., 2016). Провідну роль у розвитку АГ згідно з нейрогенною гіпотезою Г.Ф. Ланга і О.Л. Мясникова відіграє психоемоційний стрес (Ланг Г.Ф., 1950; Мясников О.Л., 1954).

Незважаючи на існування великої кількості фармацевтичних засобів, призначених для зниження артеріального тиску (АТ), на певних етапах медикаментозної терапії виникають значні перешкоди в досягненні очікуваного лікувального ефекту, пов'язані з побічною дією препаратів, наявністю факторів навколишнього середовища, які потенціюють прогресування АГ. Тому актуальним залишається пошук нових методів терапевтичного впливу на організм як цілісну систему.

Використання технологій кріоконсервування і низькотемпературного зберігання дозволить створити запаси препаратів кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові (кЯВК КК), що містять ГСК, для подальшого клінічного застосування. У зв'язку з вищевикладеним виникають передумови для вивчення впливу кЯВК КК на структурно-функціональний стан ССС з метою розробки нових методів відновлення адаптаційно-компенсаторних можливостей організму тварин на фоні експериментальної стрес-індукованої АГ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Робота виконана в рамках відомчих НДР відділу кріофізіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України № 63: «Особливості фізіологічних і патофізіологічних механізмів регуляції гомеостазу організму гомойо- і гетеротермних тварин при різних видах охолодження» (шифр – 2.2.6.63, № державної реєстрації 0111U001195); № 103: «Формування адаптаційних реакцій організму експериментальних тварин в умовах дії штучного охолодження та кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові при старінні та патологічних станах» (шифр – 2.2.6.103, № державної реєстрації 0116U003493).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – оцінити вплив кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини на структурно-функціональний стан серцево-судинної системи тварин різних вікових груп на моделі стрес-індукованої артеріальної гіпертензії.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити наступні завдання:

1. Провести оцінку збереженості, життєздатності та колонієутворюючої активності ЯВК після виділення з цільної КК та кріоконсервування.
2. Дослідити стан вегетативної регуляції серцевого ритму молодих і старих щурів після введення кЯВК КК і плазми КК людини.
3. Вивчити вплив кЯВК КК на функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції і показники АТ молодих і старих щурів зі стрес-індукованою АГ.
4. Оцінити динаміку ультраструктурних перебудов тканин і судин міокарда молодих і старих щурів зі стрес-індукованою АГ до та після введення кЯВК КК.
5. Вивчити особливості гістологічної структури міокарда тварин різних вікових груп зі стрес-індукованою АГ до та після введення кЯВК КК.
6. Визначити рівень тиреоїдних гормонів, цукру крові, оксиду азоту (NO), показники ліпідного обміну в сироватці крові молодих і старих щурів зі стрес-індукованою АГ до та після введення кЯВК КК.

Об'єкт дослідження. Структурно-функціональний стан серцево-судинної системи тварин різних вікових груп у нормі, в умовах стрес-індукованої АГ та після введення кЯВК КК.

Предмет дослідження. Кріоконсервовані ядровмісні клітини кордової крові, регуляторні механізми серцево-судинної системи, серцево-судинна система.

Методи дослідження. У роботі використано наступні методи досліджень: кріобіологічні, цитофлуориметричні, культуральні, електрофізіологічні (аналіз варіабельності серцевого ритму), електронно-мікроскопічні, гістохімічні, біохімічні, імуноферментні, методика моделювання стрес-індукованої АГ та статистичний аналіз отриманих даних.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше на моделі стрес-індукованої АГ досліджено ефективність застосування кЯВК КК із метою корекції структурно-функціональних порушень ССС у молодих та старих щурів.

Встановлено, що кріоконсервування ЯВК КК, в тому числі й стовбурових гемопоетичних, під захистом кріопротектора ДМСО в 5 % концентрації після виділення у 3 % -му розчині поліглюкіні дозволяє зберігати у життєздатному стані більше 80 % ЯВК КК і більше 90 % ГСК КК. Вперше показано, що колонієутворююча активність клітин після кріоконсервування за даним методом

зберігається на досить високому рівні та не відрізняється від контрольних значень, що свідчить про функціональну повноцінність клітин.

Вперше встановлено, що введення молодим і старим тваринам кріоконсервованої плазми КК супроводжувалося підвищенням функціональної активності ВНС на ранніх етапах експериментальних досліджень. У віддалені терміни спостережень рівень загальної спектральної потужності нейрогуморальної регуляції (ТР) відповідав початковому. На відміну від введення плазми застосування кЯВК КК значно підвищувало в усі терміни дослідження адаптаційні можливості організму тварин незалежно від їх віку. Вперше показано, що застосування кЯВК КК у щурів різних вікових груп на тлі АГ супроводжувалося збільшенням показника ТР за рахунок активації вегетативних центрів, що свідчило про відновлення у експериментальних тварин розвиненої збалансованої вегетативної регуляції. Уперше на моделі АГ встановлено, що введення молодим і старим тваринам кЯВК КК приводить до нормалізації показників АГ.

Вперше встановлено, що після введення тваринам з АГ кЯВК КК в кардіоміоцитах і ендотеліоцитах кровоносних капілярів міокарда активувалися компенсаторно-регенеративні процеси (зменшення ступеня прояву дегенеративних змін, відсутність осередків лізису ядерної мембрани, збільшення кількості мітохондрій і крист у них). При гістологічному дослідженні міокарда молодих та старих тварин з АГ вперше виявлено, що після використання кЯВК КК покращувалася трофіка тканин, зникали дистрофічні та деструктивні порушення як у результаті неангіогенезу, так і за рахунок активації репаративних процесів.

Вперше показано, що застосування кЯВК КК щурам з АГ супроводжувалося нормалізацією ліпідного профілю, рівня тиреоїдних гормонів та вмісту кінцевих продуктів обміну NO у сироватці крові.

Практичне значення отриманих результатів. Результати експериментальних досліджень впливу кЯВК КК на структурно-функціональний стан ССС тварин різних вікових груп на моделі стрес-індукованої АГ надають можливості обґрунтування перспективності застосування кЯВК КК у практичній медицині. Отримані експериментальні дані поширюють уявлення про механізми дії ЯВК КК на процеси компенсації та адаптації тварин в умовах стресу, підтверджують доцільність нормалізації нейрогуморальної регуляції для підвищення стійкості організму до дії несприятливих чинників навколишнього середовища, та можуть бути використані в лекційних курсах на профільних кафедрах. Результати досліджень дозволили розробити спосіб корекції артеріальних дисфункцій організму експериментальних тварин на тлі АГ, що підтверджено Патентом України (№ 86886).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. Основні результати роботи отримано здобувачем особисто. Автором проаналізовано наукову літературу з досліджуваної проблеми, виконано дослідження, обґрунтовано мету і завдання роботи та визначено методи їх вирішення, проведено статистичну обробку даних. Спільно з науковим керівником здійснено аналіз експериментальних даних, їх обговорення та інтерпретацію, сформульовано висновки. Морфологічні, гістохімічні та біохімічні дослідження виконано за безпосередньої участі автора.

У опублікованих спільно зі співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [2, 16, 17, 25] – у дослідженні показників збереження, життєздатності та колонієутворюючої активності ЯВК КК до і після кріоконсервування;
- у роботах [12, 13, 14,] – отримання патентів для моделювання АГ і корекції артеріальних дисфункцій.
- у роботах [1, 4, 15, 19, 20, 23, 24, 26] – у вивченні впливу плазми КК та ЯВК КК на стан вегетативної регуляції серцевого ритму молодих і старих щурів;
- у роботах [20, 33] – у вивченні впливу кЯВК КК на стан систем нейрогуморальної регуляції гіпертензивних щурів;
- у роботах [3, 5, 6, 7, 18, 27, 28, 29] – в оцінці змін ультрамікроскопічної організації тканин і судин міокарда тварин із АГ до та після введення ЯВК КК;
- у роботах [11, 21, 34] – у вивченні гістологічних змін тканин міокарда гіпертензивних щурів до та після введення ЯВК КК;
- у роботах [8, 9, 10, 22, 30, 31, 32, 35] – у визначенні показників ліпідного обміну, рівня тиреоїдних гормонів, цукру крові, NO у сироватці крові молодих і старих щурів із АГ до та після введення кЯВК КК.

Апробація матеріалів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на наукових форумах: 28 всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ліки–людині. Сучасні проблеми створення, вивчення та апробації лікарських засобів» (Харків, 2011); міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнології в клінічній медицині» (Донецьк, 2012); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 40-річчю ІПКіК НАН України «Актуальні проблеми кріобіології і кріомедицини» (Харків, 2012); науково-практичній конференції, присвяченій пам'яті академіка В.В. Фролькіса «Актуальні проблеми геронтології та геріатрії: від теорії до практики» (Київ, 2013); 4-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ужгород, 2014); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Кріоконсервація генетичних ресурсів. Сучасний стан, проблеми та перспективи» (Пушино, 2014); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Стратегії профілактики неінфекційних хвороб та шляхи їх реалізації: від постулатів минулого в майбутнє» (Харків, 2017).

Публікації. Основні положення дисертації викладено в 35 наукових публікаціях, з них 9 – у спеціалізованих наукових виданнях України, 3 – у зарубіжних наукових журналах, 9 – у збірниках науково-практичних конференцій України та 11 тез у матеріалах науково-практичних конференцій. Отримано три патенти на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Дисертацію викладено на 241 сторінках із яких 156 основного тексту. Робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, розділів власних досліджень та їх обговорення, висновків та списку використаних джерел, який містить 345 першоджерел, розміщених на 37 сторінках тексту. Роботу проілюстровано 10 таблицями та 97 рисунками, з яких 34 мікрофотографії.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено аналіз наукових публікацій, які стосуються сучасного стану проблеми виникнення захворювань ССС, в патогенезі яких провідну роль відіграє стрес, та розкрито основні механізми становлення стрес-індукованої АГ. На підставі результатів аналізу літературних даних доведено актуальність і перспективність застосування препаратів, отриманих із КК, для корекції структурно-функціональних порушень ССС.

Матеріали і методи дослідження. Основну частину досліджень проводили на базі наукових підрозділів Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України), м. Харків відповідно до загальних принципів роботи на тваринах, схвалених Комітетом із біоетики ІПКіК НАН України.

Експерименти виконували на 154 безпородних білих щурах-самцях 6- і 28-місячного віку масою 160–180 і 300–350 гр. відповідно. Кожна вікова група тварин була розподілена на три підгрупи: 1 – інтактні (контроль); 2 – щури з моделлю стрес-індукованої АГ; 3 – щури зі стрес-індукованою АГ після введення кЯВК КК. Стрес-індуковану АГ моделювали до отримання стійких підвищених цифр АТ у спеціалізованій установці (Патент України № 67200) за методикою (Й. Шош, 1981), яка нами була модифікована (Патент України № 67199).

Для виготовлення кріоконсервованого препарату ЯВК КК, який включає ГСК, нами була застосована розроблена в ІПКіК НАН України технологія виділення (Патент України № 23499) і кріоконсервування (Патент України № 92227) ЯВК КК. Забір КК людини здійснювали з вени пуповини після нормальних пологів за наявності інформованої згоди породіллі та відповідно до вимог комісії з біоетики ІПКіК НАН України. Для заготівлі КК використовували консервант «Глюгіцир» («Біофарм», Україна). Виділення ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в 3 %-му розчині поліглюкіну (ТОВ «Юрія-Фарм», Україна).

Для кріоконсервування ЯВК КК використовували кріопротектор ДМСО у кінцевій концентрації 5 %, приготований на 6 %-му розчині поліглюкіну. Суспензії клітин обробляли кріопротектором за низької позитивної температури (0–4 °С). Заморожування зразків проводили до –196 °С за спеціально розробленою запатентованою програмою (Патент України № 92227) на програмному заморожувачі («Cryosan», Німеччина). Суспензію ЯВК, оброблену ДМСО, поміщали в заздалегідь охолоджений до 0 °С програмний заморожувач і витримували 20 хв. Далі клітинну суспензію охолоджували зі швидкістю 3–3,5 град/хв до –60–65 °С і переносили в рідкий азот. Відтавання здійснювали при 37–40 °С на водяній бані при постійному погойдуванні, не допускаючи нагрівання клітинної суспензії. Кількість збережених ЯВК КК підраховували у камері Горяєва за стандартною методикою (Davis J.M., 2002). Імунофенотипування CD45⁺ і CD34⁺-клітин і визначення їх життєздатності (Schmid I. et al., 1992) виконували на проточному цитофлуориметрі «FACS Calibur» фірми («Becton Dickinson», США) із використанням реагентів («Becton Dickinson», США) з міжнародного ISHAGE протоколу. Для оцінки життєздатності клітин використовували вітальний барвник 7AAD (7-аміноактиноміцин D) («Becton Dickinson», США). Результати вимірювання оцінювали за допомогою програмного забезпечення фірми «BD-CELLQuest Pro»,

(«Becton Dickinson», США). Колонієутворюючу активність визначали на метілцелюлозному середовищі «MethoCult H4434» («StemCell Technologies», Канада). Клітини культивували 18–20 діб в умовах: 37 °C, 5 % CO₂, 95 % вологості.

Підтвердивши стійку АГ (гіпертензія стабільно зберігалася протягом 7 діб після моделювання), тваринам вводили КЯВК КК внутрішньочеревно, в 1 мл плазми в дозі 1×10^5 CD34⁺-клітин на кілограм маси, одноразово на 7-му добу після розвитку АГ. Запис електрокардіограми (тривалість 5 хв.) здійснювали на електрокардіографі серії «Полі-Спектр» («Нейрософт», Росія) у 6 стандартних відведеннях. Спектральний аналіз варіабельності серцевого ритму (BCR) (Михайлов В.М., 2002) проводили за програмою «Полі-Спектр-Ритм» («Нейрософт», Росія).

Для електронно-мікроскопічного дослідження виготовляли ультратонкі зрізи на ультрамікромомі УМТП-3М («SELMi», Україна), для їх огляду і фотографування використовували мікроскоп «EMB-100 БР» (Україна), при прискореній напрузі 75 кВ. (Боголепов М.М., 1976). Для гістологічного дослідження виготовляли зрізи на санному мікромомі «Reichert» (Австрія). Після депарафінування в ксилолі фарбували гематоксиліном Ганзена та еозином. Сполучну тканину фарбували за методом Ван Гізон із використанням барвника пікрофуксину. Забарвлення клітинних ядер проводили залізним гематоксиліном Вейгерта. Для поляризаційно-оптичної оцінки колагенових волокон використовували барвник піросириус червоний F3BA («Direct Red 80», США). Забарвлення клітинних ядер проводили гематоксиліном Ганзена. Фарбування еластичних волокон виконували відповідно до рекомендацій виробника набору «Орсеїн» («Bio-Optica Milano SpA», Італія). Дослідження зрізів проводили в світловому мікроскопі «AxioStar Plus» («Carl Zeiss», Німеччина) з використанням цифрової фотокамери («Canon Power Short A610», Японія) та комп'ютерної програми «AxioVision Rel. 4.6» («Carl Zeiss Imaging Solution GmbH», Німеччина).

Показники ліпідного профілю в сироватці крові щурів визначали за допомогою стандартних комерційних наборів фірми «DAC-SpectoMed», (Молдова) за відповідною методикою. Оптичну щільність вимірювали на біохімічному аналізаторі «Stat Fax 1904 plus» (Awareness Technology inc., USA). Концентрацію тиреоїдних гормонів визначали за методом твердофазного імуноферментного аналізу, використовуючи набори реагентів «Т3-ІФА» і «Т4-ІФА», (АлкорБио, Росія). Рівень сумарних метаболітів NO оцінювали спектрофотометричним методом за реакцією нітритів із використанням реактиву Грісса (Метельська В.О., 2005).

Під час статистичної обробки результатів перевіряли характер розподілу цифрового матеріалу в вибірках за допомогою критерію В. Шапіро-Уїлка. Середні арифметичні значення порівнювали за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок. Відмінності вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Кріоконсервування ЯВК КК: оцінка збереження, життєздатності та колонієутворюючої активності. Результати досліджень по визначенню кількості збережених ЯВК після виділення за допомогою поліглюкіну (ПГ) свідчать, що даний метод дозволяє виділяти із КК до 80 % ЯВК (CD45⁺-клітин) і до 90 % ГСК (CD34⁺-клітин). Після заморожування-відігрівання збереженість CD45⁺-клітин становила $(81,2 \pm 3,7) \%$ і CD34⁺- $(89,2 \pm 4,1) \%$ від їх початкової кількості в

концентраті. Аналіз життєздатності ЯВК КК і ГСК КК після виділення і заморожування-відігрівання представлено на рис. 1, 2. Видно, що життєздатність ЯВК і ГСК, виділених із використанням методу седиментації в ПГ практично не знижується порівняно з цільною КК. Оцінка життєздатності ЯВК КК, у тому числі й ГСК, після заморожування-відігрівання показали, що використана нами технологія кріоконсервування, яка включає виділення клітин у ПГ із подальшим заморожуванням під захистом 5 %-го ДМСО, забезпечує їх високу збереженість і життєздатність. При використанні даної технології кріоконсервування життєздатними залишалось $(82,7 \pm 2,9) \%$ CD45⁺-клітин (рис. 1, Б; 2, В). Показник життєздатності CD34⁺-клітин був вище і становив $(93,5 \pm 2,9) \%$ (рис. 2, В), що свідчить про більшу їх кріостійкість.

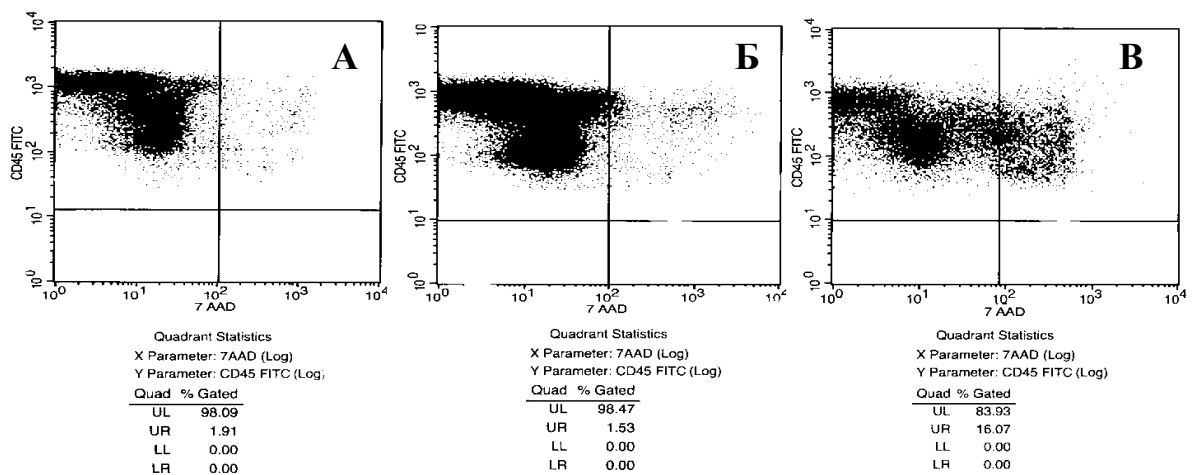


Рис. 1. Життєздатність ЯВК (CD45⁺-клітин) після кріоконсервування. А – контроль (цільна КК); Б – клітини після виділення; В – клітини після заморожування-відігрівання. Дані типового експерименту

Оцінка популяційного складу ЯВК КК показала, що після виділення клітин за допомогою ПГ процентне співвідношення моноцитів, лімфоцитів і гранулоцитів практично не змінювалося порівняно з показником цільної КК. Дослідження кожної популяції ЯВК після заморожування-відігрівання встановило, що збереженими залишалось до $(97 \pm 4,2) \%$ лімфоцитів і до $(94 \pm 3,9) \%$ моноцитів. Для гранулоцитів даний показник був значно меншим $(67,8 \pm 3,3) \%$.

Був проведений аналіз життєздатності різних популяцій ЯВК після виділення і заморожування-відігрівання (рис. 3). Встановлено, що виділення ЯВК за допомогою ПГ не знижує життєздатності лімфоцитів, моноцитів і гранулоцитів. Результати оцінки життєздатності популяцій ЯВК після заморожування-відігрівання свідчать, що даний показник для лімфоцитів і моноцитів залишався на високому рівні і був понад 95 % (рис. 3). Кількість життєздатних гранулоцитів зменшувалася і становила $(69,8 \pm 3,7) \%$. Це свідчить про те, що зниження життєздатності і збереження загальної популяції ЯВК відбувається в основному за рахунок гранулоцитів. Можна зробити висновок, що дана технологія кріоконсервування ЯВК КК дозволяє зберігати на досить високому рівні не тільки кількість і життєздатність ГСК, які є

найбільш важливими критеріями визначення терапевтичної дози препарату, але й забезпечує збереження і життєздатність їх клітинного мікрооточення.

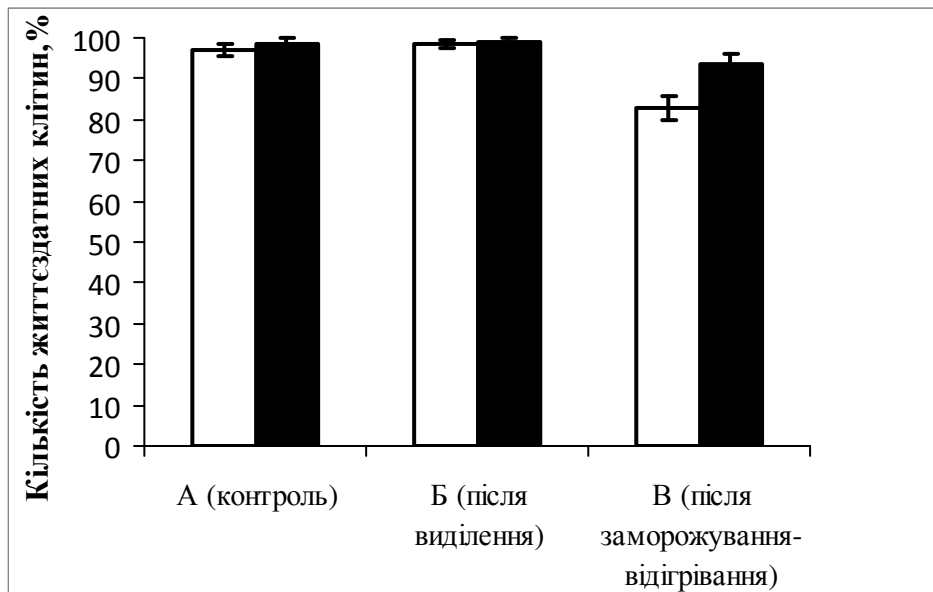


Рис. 2. Кількість життєздатних CD45⁺ (□) і CD34⁺ (■) – клітин після виділення та заморожування-відігрівання

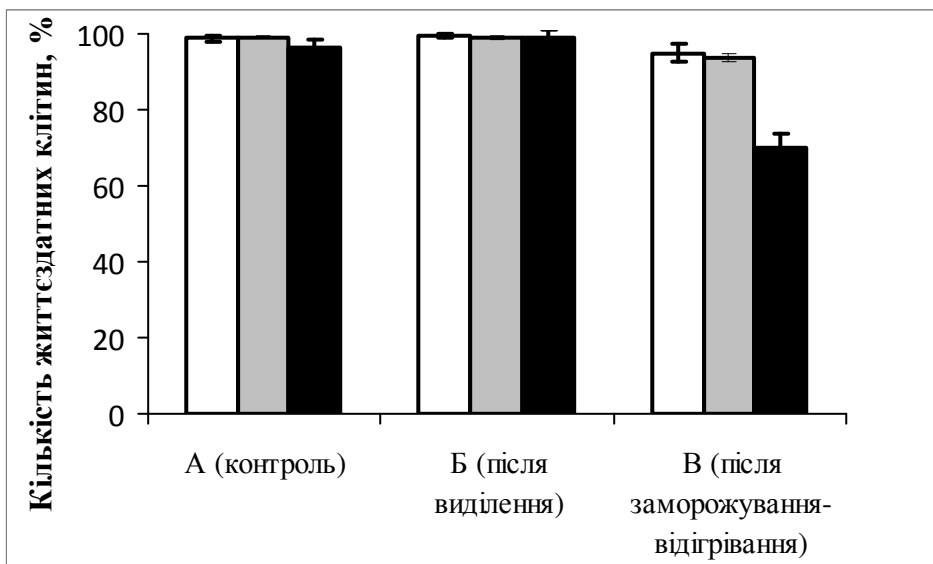


Рис. 3. Кількість життєздатних лімфоцитів (□), моноцитів (■) і гранулоцитів (■) після виділення та заморожування-відігрівання

На підставі активності колонієутворювання і спектра отриманих CFU (колонієутворюючих одиниць) можна судити про функціональний стан досліджуваних клітин. Після культивування клітин КК нами відзначена досить висока їх функціональна і клоногенна активність як до, так і після кріоконсервування (рис. 4). Клітини утворювали колонії, що мають еритроїдну (CFU-E і BFU-E), гранулоцитарну (CFU-G), макрофагальну (CFU-M), гранулоцитарно-макрофагальну (CFU-GM) і змішану (CFU-GEMM) морфологію. Це характерно для ГСК і клітин-попередників гемопоетичного ряду (рис. 4). Загальна кількість колоній до та після кріоконсервування змінювалася незначно і становила $(228,6 \pm 31,4)$ і $(247,6 \pm 6,8)$ відповідно.

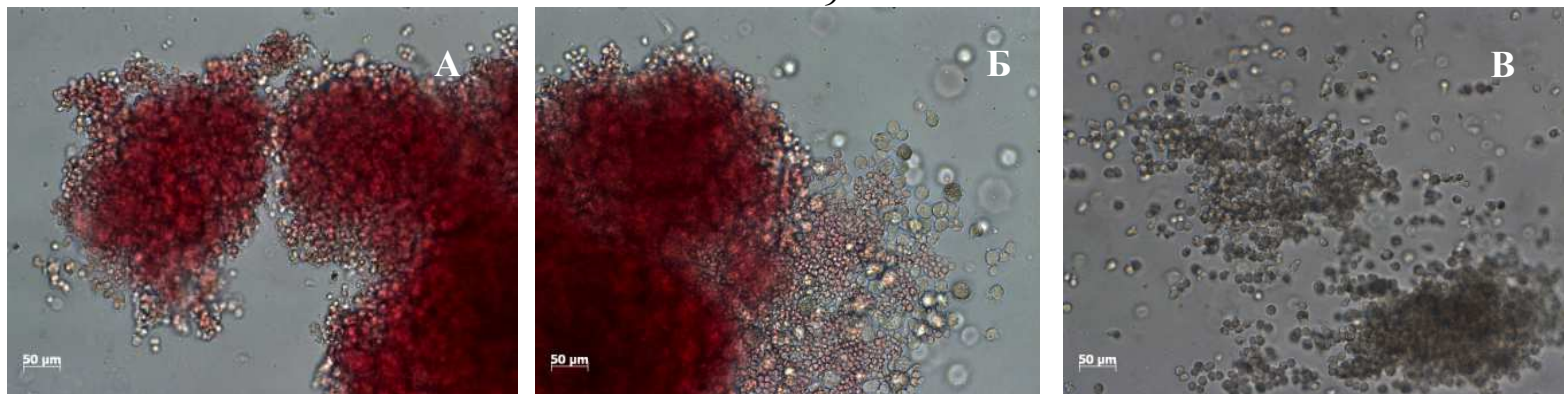


Рис. 4. Колонієутворююча активність кордової крові після кріоконсервування. А – BFU-E бурстутворююча колонія; Б – CFU-GEMM змішана колонія; В – CFU-GM гранулоцитарно-макрофагальна колонія

Таким чином, результати досліджень свідчать про те, що використання технології кріоконсервування ЯВК, у тому числі й ГСК, яка включає виділення клітин ПГ із подальшим їх заморожуванням із 5 %-м ДМСО за спеціальною багатоетапною програмою, дозволяє зберігати не тільки досить високу кількість ЯВК КК і ГСК КК, але й їх структурно-функціональну повноцінність.

Вплив кЯВК КК на функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції і показники АТ у молодих і старих щурів зі стрес-індукованою АГ. При порівняльному аналізі застосування кЯВК КК і плазми КК показано, що введення ЯВК КК має тривалий позитивний вплив на стан вегетативної регуляції серцевого ритму, істотно підвищуючи функціональні можливості організму тварин незалежно від віку. Ефект дії плазми КК найбільш виражено проявляється на початкових етапах після введення і нівелюється у віддалені терміни спостережень.

У молодих і старих щурів зі стрес-індукованою АГ значення ТР істотно знижувалося в порівнянні з показником контролю (рис. 5, 6). Дані зміни були чітко виражені як через 3 доби, так і через тиждень та місяць після розвитку патологічного стану. Відзначали значне зменшення активності вегетативної регуляції серцевого ритму (HF- і LF-компонент), та тенденцію до зниження гуморально-метаболических впливів (VLF-компонент). Таким чином, під час прогресування АГ вегетативне забезпечення серцевої діяльності більшою мірою здійснювалося за рахунок переходу процесу регуляції на повільний, але більш стабільний гуморально-метаболический рівень. Вже через 3 доби після введення молодим і старим гіпертензивним щурам кЯВК КК відзначалося збільшення показників ТР до контрольних значень, що було результатом підвищення тону симпатичного і парасимпатичного відділу ВНС на тлі практично незмінної активності гуморальної регуляції (рис. 5, 6). У віддалені терміни спостереження рівень ТР істотно зростав не тільки по відношенню до попередніх етапів експериментальних досліджень, а й до контролю. Підйом ТР був результатом активації діяльності як ВНС, так і гуморальної ланки регуляції. Такі зміни є фізіологічно значущими, оскільки гомеостатичні властивості цілісного організму – результат одночасної дії багатьох складно організованих регуляторних механізмів, серед яких одне з важливих місць займає вегетативна регуляція, яка забезпечує сталість рівнів обміну речовин і енергії в організмі. У контрольних молодих і старих тварин значення АТ відповідало $(99,72 \pm 3,57)$ та $(103,92 \pm 2,96)$ мм рт.ст. відповідно.

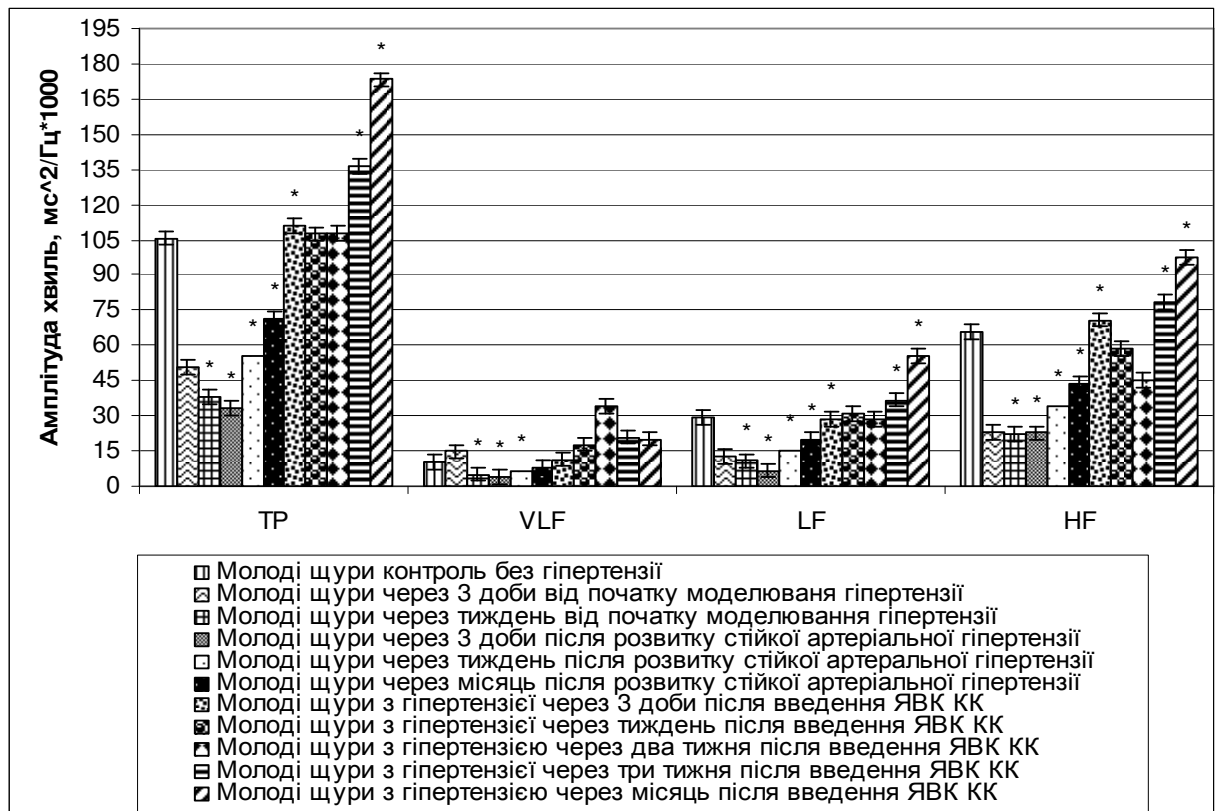


Рис. 5. Показники ВСР у молодих щурів з АГ до та після введення ЯВК КК

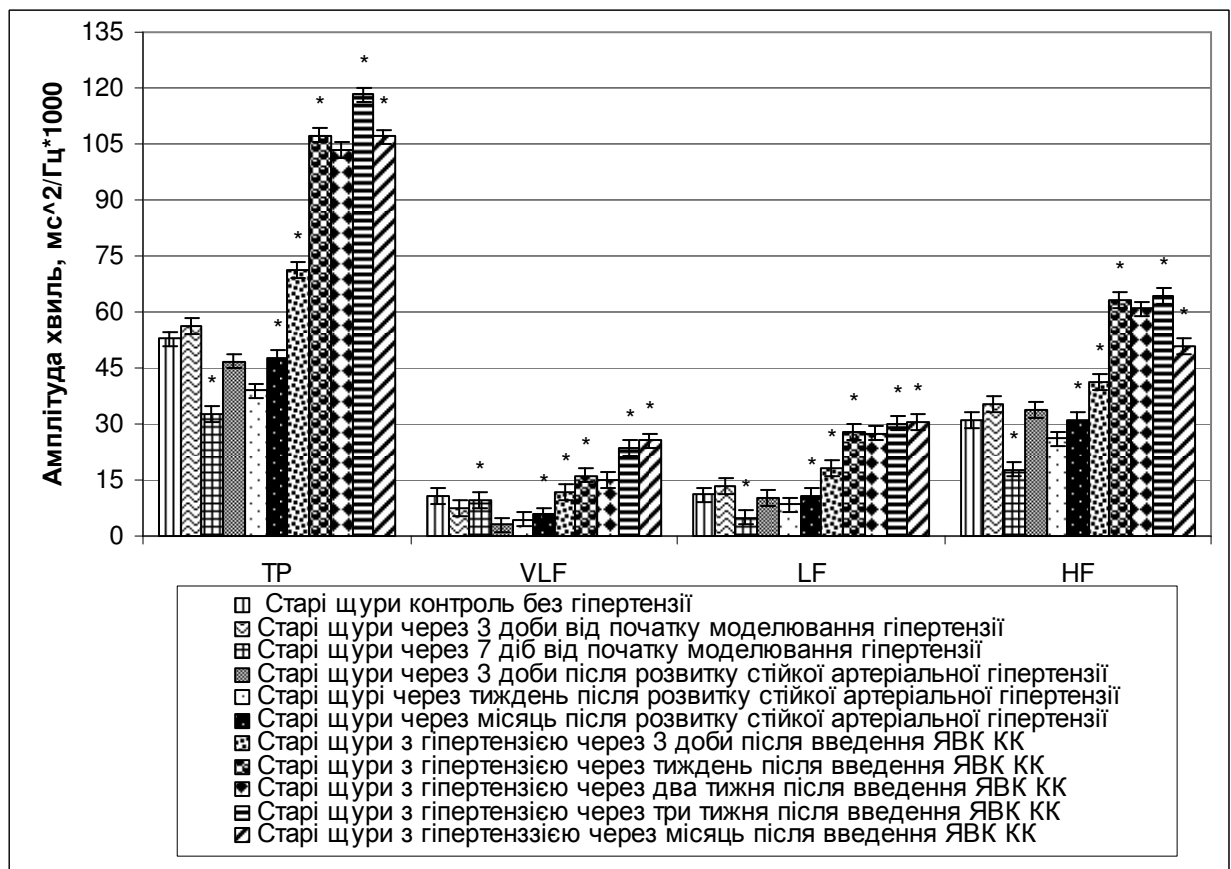


Рис. 6. Показники ВСР у старих щурів з АГ до та після введення ЯВК КК

Через тиждень від початку моделювання АГ у молодих та старих тварин показник АТ був стабільно високим ($161,98 \pm 5,47$) та ($179,25 \pm 2,29$) мм рт.ст. відповідно. На 3-тю добу, через тиждень і місяць після розвитку стійкої АГ

зберігався значуще високий рівень АТ по відношенню до контролю. що, на нашу думку, пов'язано з підвищенням тону симпатoadреналової системи, яка має потужну вазопресорну дію. На 3-тю добу після введення молодим тваринам із АГ кЯВК КК показник АТ мав тенденцію до зниження порівняно з групою гіпертензивних щурів, але залишався значуще вище контрольного. Через тиждень і місяць після застосування ЯВК КК рівень АТ знижувався і практично відповідав контрольному значенню ($(115 \pm 2,89)$ мм рт.ст.). У старих тварин з АГ показник АТ знижувався на 7-му добу після введення ЯВК КК, проте залишався вище контрольного. Через місяць він відповідав контрольному ($(113,75 \pm 3,75)$ мм рт.ст.).

Ультраструктурні перебудови тканин і судин міокарда гіпертензивних щурів до та після введення кЯВК КК. На 30-ту добу після розвитку АГ в ультраструктурній організації кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда молодих та старих щурів були присутні дистрофічні і деструктивні зміни органел. Виявлялися осередки лізису ядерної мембрани, у саркоплазмі були присутні включення ліпідів, спостерігалася невелика кількість полісом, рибосом і гранул глікогену. Окремі кардіоміоцити містили витончені пучки міофібрил. В мітохондріях превалювали катаболічні процеси, що структурно проявлялося вогнищевим, а іноді і тотальним лізисом мембран і крист (рис. 7, А, Б). Саркоплазматична мембрана була потовщена і містила осередки руйнування. У цитоплазмі відростків ендотеліоцитів були присутні поодинокі мікропіноцитозні пухирці, вторинні лізосоми і включення ліпідів, що свідчило про розвиток біоенергетичної недостатності і порушення скоротливої здатності кардіоміоцитів.

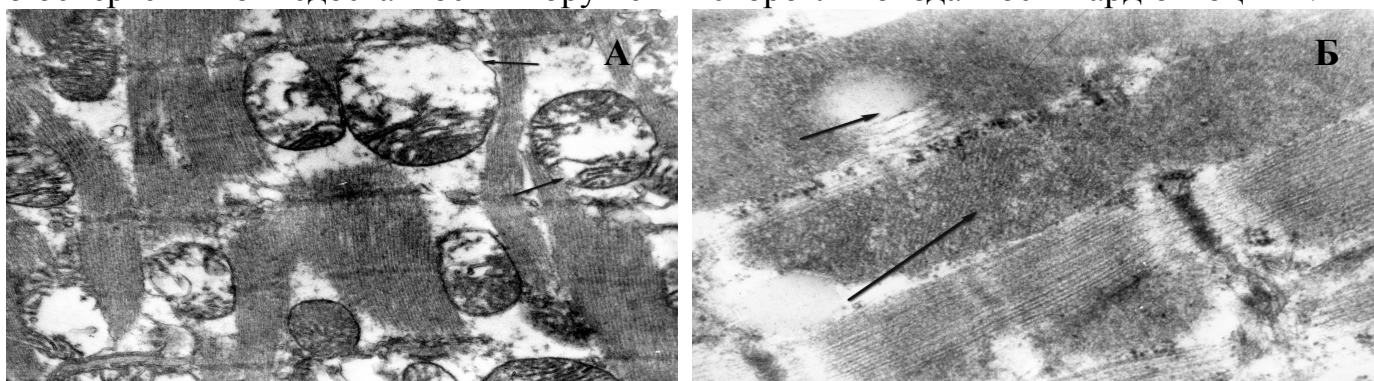


Рис. 7. Ультраструктура кардіоміоцитів міокарда молодих (А) та старих (Б) щурів на 30-ту добу після розвитку АГ: А – осередки лізису зовнішніх мембран і крист мітохондрій, $\times 34\,000$; Б – лізис зовнішніх мембран і дегенеративні зміни мітохондрій, $\times 39\,000$. Контрастовано цитратом свинцю

Через місяць після введення молодим і старим щурам із АГ кЯВК КК субмікроскопічна архітектоніка тканин і судин міокарда в основному мала типову будову, яка властива інтактним тваринам. Істотно підвищувалася метаболічна і репаративна активність, покращувалися біоенергетичні процеси. Міофібрили мали паралельну орієнтацію і добре виражену смугастість. Мітохондрії з поліморфним матриксом містили численні паралельно орієнтовані кристи, збільшувалася кількість гранул глікогену, рибосом і полісом (рис. 8, А). У відростках ендотеліоцитів з'являлися мікропіноцитозні пухирці (рис. 8, Б), що свідчило про підвищення функціональної активності міокарда і трансцелюлярного транспорту речовин і електролітів. Таким чином, введення молодим і старим гіпертензивним тваринам

кЯВК КК підвищує скоротливу здатність міокарда за рахунок нормалізації внутрішньоклітинної біоенергетики, тісно пов'язаної з мітохондріями.

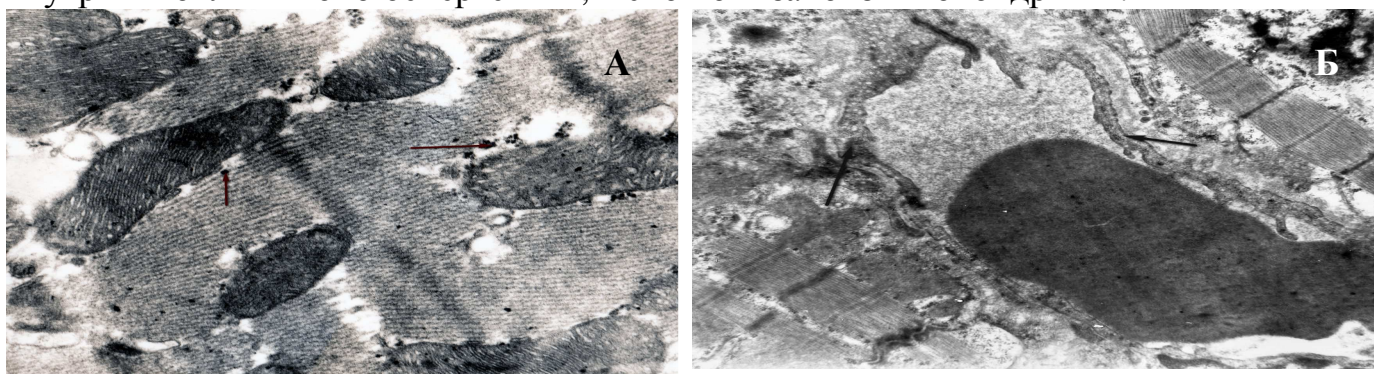


Рис. 8. Ультраструктура кардіоміоцитів міокарда молодих (А) та старих (Б) щурів із АГ на 30-ту добу після введення ЯВК КК: А – гранули глікогену в саркоплазмі, $\times 32\,000$; Б – мікропіноцитозні пухирці в цитоплазмі, $\times 49\,000$. Контрастовано цитратом свинцю

Гістологічні зміни структури міокарда молодих і старих гіпертензивних щурів під впливом кЯВК КК. У молодих та старих щурів протягом місяця після розвитку АГ спостерігали прогресуюче порушення кровообігу, дистрофічні і деструктивні зміни м'язових волокон міокарда. Виявлялися морфологічні ознаки осередкової ішемії міокарда, спазму артеріальних судин, парезу венозних судин і капілярів, периваскулярного набряку і кардіосклерозу (рис. 9). Компенсування функції міокарда шляхом внутрішньоклітинної гіпертрофії кардіоміоцитів призводило до посилення патологічного процесу. Структурні порушення міокарда старих щурів через місяць після розвитку АГ вказували на прогресуючий характер деструктивних змін. За поширеністю і ступенем прояву вони значно перевищували пошкодження серцевого м'яза, які мали місце у молодих тварин.

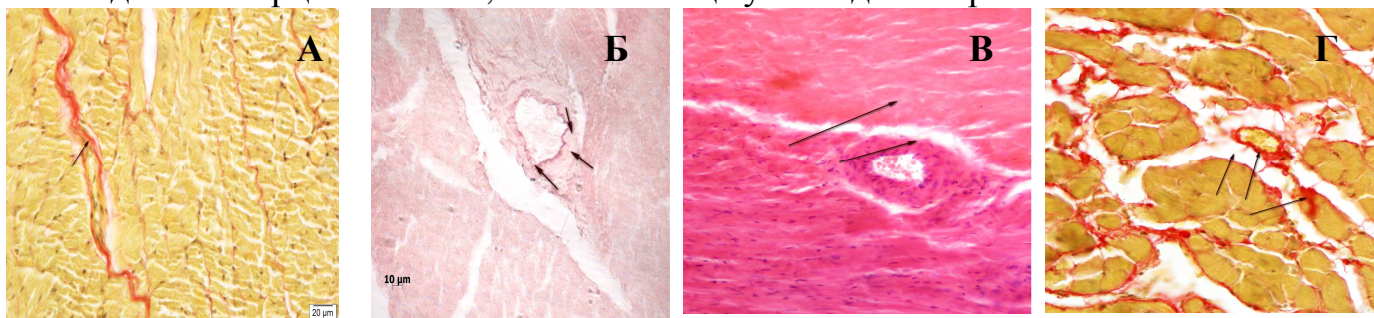


Рис. 9. Ділянки міокарда лівого шлуночка молодих (А, Б) та старих (В, Г) щурів на 30-ту добу після розвитку АГ: А – периваскулярний кардіосклероз. Забарвлення пікросиріусом червоним, $\times 400$; Б – нерівномірно потовщені стінки судини, звивисті контури внутрішньої еластичної мембрани, просвіт судини неправильної форми. Забарвлення орсеїном, $\times 200$; В – осередок ішемічно змінених м'язових волокон, спазмована судина з потовщеною стінкою на межі демаркаційного запалення. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$; Г – виражений периваскулярний та інтерстиціальний склероз і набряк. Забарвлення пікросиріусом червоним, $\times 400$

На 7 і особливо 30-ту добу після введення кЯВК КК у міокарді молодих та старих гіпертензивних щурів у структурній організації пошкоджених ділянок міокарда спостерігалися ознаки репаративних процесів. Прояви периваскулярного і інтерстиціального набряку зменшувалися. Підвищувалася щільність фіброblastів в

інтерстиціальній сполучній тканині і навколо кровоносних судин, були відсутні ділянки з ознаками осередкової ішемії міокарда та кардіосклерозу. Ці компенсаторні процеси супроводжувалися неоангіогенезом як шляхом брунькування, так і шляхом аутогенеза (рис. 10).

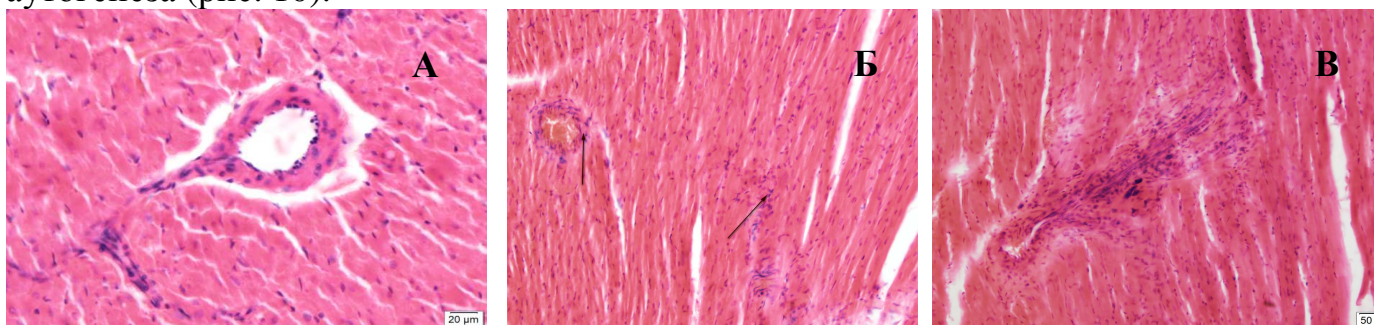


Рис. 10. Ділянки міокарда лівого шлуночка молодих (А, Б) та старих (В) щурів із АГ на 7-му (А) і 30-ту (Б, В) доби після введення ЯВК КК: А – периваскулярний набряк, потовщена стінка судини, судинна брунька з проліферуючих ендотеліоцитів, $\times 400$; Б – підвищена щільність фіброblastів у стінці повнокрової судини і інтерстиціальній сполучній тканині, $\times 200$; В – новоутворення судин аутогенним шляхом, $\times 200$. Забарвлення гематоксиліном та еозином

Оцінка біохімічних показників сироватки крові щурів зі стрес-індукованою АГ після застосування кЯВК КК. У молодих і старих тварин зі стрес-індукованою АГ відбувається зміщення ліпідного профілю в бік атерогенності. Рівень холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ХСЛПВЩ) знижується на тлі підвищення рівня загального холестерину (ЗХ), тригліцеридів (ТГ), холестерину ліпопротеїнів низької та дуже низької щільності (ХСЛПНЩ, ХСЛПДНЩ), коефіцієнта атерогенності (КА). Відмічається патологічна гіперліпідемія, яка згодом може призводити до атеросклеротичних змін судин. Введення молодим і старим щурам з АГ кЯВК КК сприяє корекції ліпідного гомеостазу. Нормалізується КА за рахунок підвищення рівня ХСЛПВЩ і зниження ЗХ, ХСЛПНЩ і ХСЛПДНЩ. Можна припустити, що застосування ЯВК КК нівелює зміни показників ліпідного профілю, які спостерігаються при АГ, а самі клітини мають антиатерогенну дію.

Показано, що стрес-індукована АГ призводить до підвищення рівня тиреоїдних гормонів у сироватці крові молодих тварин через місяць, а у старих – на 7-му добу після виникнення патології. Очевидно, гіперфункція щитоподібної залози, що виникає у відповідь на пошкодження тканин і судин при АГ є неспецифічною реакцією компенсації, оскільки тиреоїдні гормони, завдяки стимуляції синтезу білків, сприяють клітинним регенеративним процесам і репарації пошкоджених структур. Через місяць після введення молодим і старим щурам із АГ кЯВК КК нормалізується тиреоїдний статус. У сироватці крові незначно збільшується концентрація тиреоїдних гормонів (в межах фізіологічної норми). З огляду на провідну роль гормонів щитоподібної залози в регуляції загального гомеостазу організму корекція виявлених порушень гормонального статусу після використання ЯВК КК є одним із основних чинників, які сприяють підвищенню функціональних резервів і адаптаційних можливостей організму щурів з АГ. Встановлено, що активність NO, як патогенетичного регуляторного фактора, істотно знижується у

молодих і старих щурів на тлі АГ. Очевидно, що в зв'язку з розвитком дистрофічних процесів ендотелію судин у гіпертензивних тварин здатність клітин до синтезу NO зменшується. Після застосування кЯВК КК у сироватці крові тварин збільшується вміст нітритів, що сприяє нормалізації дисбалансу системи локальної регуляції гомеостазу та судинного тону. Виявлені зміни є фізіологічно значущими, оскільки спрямовані на покращення функції та трофіки судин міокарда.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукового завдання – розробка нових методів корекції структурно-функціональних порушень ССС на моделі стрес-індукованої АГ у молодих і старих щурів.

На підставі результатів аналізу електрофізіологічних, морфофункціональних, гістологічних, біохімічних показників тварин різних вікових груп зі стрес-індукованою АГ обґрунтовано доцільність і ефективність застосування кЯВК КК з метою відновлення структурно-функціональних порушень ССС.

1. Показано, що кріоконсервування ЯВК КК, в тому числі й стовбурових гемопоетичних, під захистом кріопротектора ДМСО в концентрації 5 % після виділення в поліглюкіні дозволяє зберігати у життєздатному стані більше 80 % CD45⁺ і більше 90 % CD34⁺-клітин. Колонієутворююча активність клітин після кріоконсервування за даним методом була на досить високому рівні і не відрізнялася від контрольних значень, що свідчить про їх функціональну повноцінність. Зміни популяційного складу ЯВК КК до та після кріоконсервування свідчать про високу кріостійкість лімфоцитів і моноцитів (життєздатність більше 95 %), а зменшення основної кількості загальної популяції ЯВК КК та показника їх життєздатності відбувалося за рахунок гранулоцитів.

2. Використання у експериментальних тварин модифікованої методики моделювання стрес-індукованої АГ призводить до стійкого підвищення показників АТ, розвитку виражених структурних і ультраструктурних змін ССС, порушень вегетативної регуляції серцевого ритму, ліпідного профілю, тиреоїдного статусу та активності оксиду азоту.

3. При порівняльному аналізі ефективності застосування кЯВК КК і плазми КК встановлено, що введення кЯВК КК має тривалий позитивний вплив на стан вегетативної регуляції серцевого ритму, тим самим істотно підвищуючи функціональні можливості організму тварин незалежно від віку. Ефект дії плазми КК найбільш виражено проявляється на початкових етапах після введення і нівелюється у віддалені терміни спостережень. Показано, що внаслідок розвитку АГ різко знижуються всі досліджувані параметри ВСР. Під час прогресування патології вегетативне забезпечення серцевої діяльності здійснюється за рахунок переходу регуляції на повільний гуморально-метаболічний рівень. Після введення гіпертензивним щурам кЯВК КК активується ВНС і гуморальна ланка регуляції та нормалізуються показники АТ.

4. Результати електронно-мікроскопічного дослідження кардіоміоцитів і ендотеліоцитів кровоносних капілярів міокарда молодих і старих тварин із моделлю стрес-індукованої АГ свідчать про наявність дистрофічних процесів в органелах із елементами деструкції мембран. Після застосування кЯВК КК на електронограмах відзначаються перебудови компенсаторного характеру: підвищується скорочувальна

здатність міокарда за рахунок нормалізації внутрішньоклітинної біоенергетики, яка тісно пов'язана з мітохондріями. Зменшується ступінь прояву дегенеративних змін у тканинах і судинах міокарда.

5. Під час гістологічного дослідження тканин і судин міокарда молодих і старих тварин з АГ виявлено ознаки розвитку дистрофічних і деструктивних змін м'язових волокон: спазм артеріальних судин, парез венозних судин і капілярів, порушення цілісності судинної стінки, периваскулярний та інтерстиціальний набряк, кардіосклероз. Після введення кЯВК КК виявляються ознаки відновлення структури міокарда: покращення трофіки тканин, зникнення дистрофічних і деструктивних змін як в результаті процесу неоангіогенезу, так і за рахунок активації репаративних процесів.

6. Встановлено, що у щурів різних вікових груп внаслідок стрес-індукованої АГ зміщується ліпідний профіль в бік атерогенності, спостерігаються порушення тиреоїдного статусу. Після введення кЯВК КК нормалізуються ліпідний гомеостаз, рівень тиреоїдних гормонів, підвищується вміст нітритів у сироватці крові, що сприяє відновленню балансу системи локальної регуляції гомеостазу та судинного тону.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових журналах

1. Бабийчук Л. А., Грищенко В. И., **Бабийчук Л. В.** Действие препарата стволовых гемопоэтических клеток кордовой крови человека на некоторые показатели вегетативной регуляции у старых крыс. *Буковинський медичний вісник*. 2009. Т. 13. № 4. С. 20–23.

2. Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность ядросодержащих клеток пуповинной крови после криоконсервирования / Л. А. Бабийчук, В. И. Грищенко, П. М. Зубов, О. Л. Зубова, В. В. Рязанцев, **Л. В. Бабийчук**, О. В. Кудогоцева, С. А. Любич. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2010. Т. 5. № 3. С. 77–81.

3. **Бабийчук Л. В.**, Невзоров В. П., Невзорова О. Ф. Динамика изменений ультраструктуры кардиомиоцитов миокарда старых крыс в процессе развития и прогрессирования неврогенной артериальной гипертензии. *Харківська хірургічна школа*. 2012. Т. 54, № 3. С. 86–91.

4. **Бабийчук Л. В.**, Бабийчук В. Г., Мамонтов В. В. Влияние гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у крыс разного возраста. *Проблемы старения и долголетия*. 2012. Т. 21, № 1. С. 14–23.

5. Динамика ультраструктурных перестроек кардиомиоцитов миокарда старых крыс с неврогенной артериальной гипертензией после введения криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток / **Л. В. Бабийчук**, В. Г. Бабийчук, В. П. Невзоров, О. Ф. Невзорова. *Харківська хірургічна школа*. 2012. Т. 55, № 4. С. 47–52.

6. Динамика ультраструктурных перестроек кардиомиоцитов миокарда молодых крыс в процессе развития и прогрессирования неврогенной артериальной

гіпертензії / **Л. В. Бабійчук**, В. Г. Бабійчук, В. П. Невзоров, О. Ф. Невзорова. *Харківська хірургічна школа*. 2012. Т. 56, № 5. С. 24–29.

7. Влияние криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови на ультраструктурную архитектуру миокарда молодых крыс с неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензией / **Л. В. Бабійчук**, В. Г. Бабійчук, В. П. Невзоров, О. Ф. Невзорова. *Харківська хірургічна школа*. 2012. Т. 57, № 6. С. 50–55.

8. Уровни липидов и глюкозы в сыворотке крови крыс на фоне стресс-индуцированной артериальной гипертензии и после введения криоконсервированной кордовой крови / **Л. В. Бабійчук**, Л. А. Сиротенко, Н. Г. Малова, С. Н. Коваль, В. Г. Бабійчук, В. В. Мамонтов. *Проблеми ендокринної патології*. 2014. № 3. С. 89–96.

9. Влияние криоконсервированных ядродержащих клеток пуповинной крови на состояние гомеостаза у животных разных возрастных групп при стресс-индуцированной артериальной гипертензии / **Л. В. Бабійчук**, В. Г. Бабійчук, Л. А. Сиротенко, Н. Г. Малова, С. Н. Коваль. *Гены и Клетки*. 2014. Т. IX № 4. С. 88–94. SCOPUS

10. Влияние криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови на уровень конечных продуктов обмена оксида азота в сыворотке крови крыс различных возрастных групп на фоне стресс-индуцированной артериальной гипертензии / **Л. В. Бабійчук**, В. Г. Бабійчук, Л. А. Сиротенко, Н. Г. Малова, С. Н. Коваль. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2015. Т. 68. № 3. С. 5–9.

11. **Бабійчук Л. В.**, Коваль С. Н., Бабійчук Г. А. Структура миокарда молодых гипертензивных крыс после введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови. *Проблеми криобиології і криомедицини*. 2016. Т. 27, № 3. С. 271–288. SCOPUS.

Патенти України на корисну модель

12. Спосіб моделювання стрес-індукованої артеріальної гіпертензії: пат. 67199 Україна. МПК⁷ G09B 23/28 / **Л. В. Бабійчук**, В. Г. Бабійчук, О. В. Козлов, В. В. Мамонтов; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. № u201108117, заяв. 29.06.2011. Опубл. 10.02.2012. Бюл. № 3.

13. Пристрій для моделювання стрес-індукованої артеріальної гіпертензії: пат. 67200 Україна. МПК⁷ G09B 23/28 / О. В. Козлов, **Л. В. Бабійчук**, В. Г. Бабійчук, В. В. Мамонтов; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. № u201108121, заявл. 29.06.2011. Опубл. 10.02.2012. Бюл. № 3.

14. Спосіб корекції артеріальних дисфункцій організму експериментальних тварин при стрес-індукованій артеріальній гіпертензії: пат. 86886 Україна. МПК⁷ A61K 35/14, A61P 9/12 / **Л. В. Бабійчук**, В. Г. Бабійчук, В. В. Мамонтов, П. М. Зубов; заявник та патентовласник ІПКіК НАН України. № u201309719, заявл. 05.08.2013. Опубл. 10.01.2014. Бюл. № 1.

Статті у збірниках матеріалів конференцій

15. **Бабійчук Л. В.**, Мамонтов В. В. Влияние гемопоэтических стволовых клеток на показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у экспериментальных животных. *Медицина XXI століття: матеріали наук.-практ.*

конференції молодих вчених, присвяченій 200-річчю від дня народження М.І. Пирогова, Харків, 30 листопада 2010 р, Харків, 2010. С. 6–7.

16. Оценка функционального состояния стволовых гемопоэтических клеток кордовой крови в препарате «криоцелл-гемоклетки» / **Л. В. Бабийчук**, С. А. Любич, Т. Ф. Петренко, П. М. Зубов, Л. А. Бабийчук. *Ліки-людині. Сучасні проблеми створення, вивчення та апробації лікарських засобів: матеріали 28 всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 03 січня 2011 р*, Харків, 2011. С. 8–10.

17. Крיוконсервирование гемопоэтических клеток кордовой крови: комплексная оценка структурно-функциональной полноценности / Л. А. Бабийчук, П. М. Зубов, В. В. Рязанцев, **Л. В. Бабийчук**, О. Л. Зубова, О. В. Кудогоцева. *Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участ. Киев, 27-28 жовтня 2011 р*. К. 2011. С. 19–21.

18. Ультроструктурные изменения кардиомиоцитов миокарда старых крыс с экспериментальной неврогенной артериальной гипертензией до и после введения крיוконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови / **Л. В. Бабийчук**, С. Н. Коваль, В. Г. Бабийчук. *Биотехнологии в клинической медицине: материалы междунар. науч.-практ. конференци Донецк, 19-20 сентября 2012 г. Вестник неотложной и восстановительной медицины*. 2012. Т. 13, № 1. С. 23–26.

19. **Бабийчук Л. В.**, Бабийчук В. Г. Влияние крיוконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у молодых крыс. *Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины: науч. конф. с междунар. участием, посвящённая 40-летию ИПКиК НАНУ Харьков, 18-19 октября 2012 г, Харьков. Проблемы криобиологии*. 2012. Т. 22, № 3. С. 308.

20. **Бабийчук Л. В.**, Мамонтов В. В., Бабийчук В. Г. Влияние крיוконсервированного препарата кордовой крови на некоторые показатели спектрального анализа вариабельности сердечного ритма у старых крыс с артериальной гипертензией. *Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике: науч.-практ. конференция и школа, посвященная памяти академика В.В. Фролькиса, Киев, 16-17 мая 2013. Проблемы старения и долголетия*. 2013. Т. 22. С. 9–10.

21. **Бабийчук Л. В.**, Нікольченко О. А. Морфологічні зміни міокарда у щурів різного віку в умовах моделювання артеріальної гіпертензії. *Зб. тез 4 з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом Ужгородський нац. ун. Ужгород, 17-20 вересня 2014 р*, Ужгород, 2014. С. 95.

22. Особенности развития эндотелиальной дисфункции у крыс различных возрастных групп на фоне стресс-индуцированной артериальной гипертензии / **Л. В. Бабийчук**, В. Г. Бабийчук, С. Н. Коваль, И. В. Комаров *Ендотеліальна дисфункція: матеріали науч.-практ. конф., Киев, 12-13 ноября 2015 г.* К., 2015. С. 60–61.

23. Влияние ритмических экстремальных холодовых воздействий и кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечным ритмом у животных различных возрастных групп в норме и при алиментарном ожирении / Ю. В. Руднева, В. Г. Бабийчук, Е. А. Чернявская, В. В. Кулик, **Л. В. Бабийчук**. *Крיוконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и*

перспективы: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, Пущино, 28-30 октября 2014г. Биофизика живой клетки. 2014. Т. 10. С. 171–173.

Тези конференцій

24.**Бабийчук Л. В.** Влияние гемопоэтических стволовых клеток на состояние систем нейрогуморальной регуляции. *Перспективні технології діагностики і лікування терапевтичних захворювань: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 21 жовтня 2010 р.* Харків, 2010. С. 9.

25.**Бабийчук Л. В.,** Петренко Т. Ф **Бабийчук Л. А.** Клоногенная активность препаратов кордовой крови после криоконсервирования. *Щорічні терапевтичні читання: нові технології та міждисциплінарні питання у загально терапевтичній практиці: матеріали наук.-практ. конф. Харків, 14-15 квітня 2011р.* Харків, 2011. С. 16.

26.Влияние плазмы кордовой крови на функциональное состояние систем нейрогуморальной регуляции у старых крыс / **Л. В. Бабийчук,** П.М. Зубов, В. Г. Бабийчук, В. В. Мамонтов. *Медицина наука і клінічна практика: минуле, сьогодні, майбутнє: матеріали наук.-практ. конф., присвяченої 150 річчю Харківського медичного тов-ва, Харків, 20 жовтня 2011р.* Харків. Харків, 2011. С. 19.

27.Ультраструктурные изменения кардиомиоцитов миокарда старых крыс в процессе развития и прогрессирования неврогенной артериальной гипертензии / **Л. В. Бабийчук,** В. Г. Бабийчук, В. П. Невзоров. *Щорічні терапевтичні читання: оптимізація профілактики, діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб: матеріали наук.-практ. конф. Харків, 19-20 квітня 2012 р.* Харків 2012. С. 10.

28.**Бабийчук Л. В.,** Коваль С. Н. Динамика ультраструктурных перестроек кардиомиоцитов миокарда старых крыс с неврогенной артериальной гипертензией после введения криоконсервированных гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови. *Мультидисциплінарний підхід – ключ до успішної терапевтичної науки та практики»: матеріали наук.-практ. конф. Харків, 18 жовтня 2012 р.* Харків, 2012. С. 11.

29.Влияние криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови на ультраструктурную архитектуру миокарда молодых крыс с неврогенной стресс-индуцированной артериальной гипертензией / **Л. В. Бабийчук,** С. Н. Коваль, В. Г. Бабийчук. *Щорічні терапевтичні читання: лікувально-діагностичні технології сучасної терапії: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 25-26 квітня 2013 р.* Харків, 2013. С. 20.

30.Изменение уровня липидов в сыворотке крови старых крыс на фоне стресс-индуцированной артериальной гипертензии / **Л. В. Бабийчук,** С. Н. Коваль, В. Г. Бабийчук. *Наукові та практичні аспекти хронізації неінфекційних захворювань внутрішніх органів: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 06 листопада 2014 р.* Харків, 2014. С. 19.

31.Влияние криоконсервированной кордовой крови на динамику изменения уровня липидов в сыворотке старых крыс на фоне стресс-индуцированной артериальной гипертензии / **Л. В. Бабийчук,** С. Н. Коваль, В. Г. Бабийчук, И. В. Комарова. *Щорічні терапевтичні читання: від досліджень до реалій клінічної практики XXI століття»: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 23–24 квітня 2015 р.* Харків, 2015. С. 22.

32. Влияние криоконсервированной кордовой крови на динамику изменения липидов в сыворотке молодых крыс на фоне стресс-индуцированной артериальной гипертензии / **Л. В. Бабийчук**, С. Н. Коваль, В. Г. Бабийчук, И. В. Комарова. *Хронічні неінфекційні захворювання: заходи профілактики і боротьби з ускладненнями: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 5 листопада 2015 р.* Харків, 2015. С.15.

33. **Бабийчук Л. В.**, Коваль С. Н., Бабийчук В. Г. Вариабельность сердечного ритма молодых крыс на фоне стресс-индуцированной АГ. *Щорічні терапевтичні читання: профілактика неінфекційних захворювань на перехресті терапевтичних наук: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків, 21 квітня 2016 р.* Харків, 2016. С. 19.

34. **Бабийчук Л. В.**, Коваль С. Н., Бабийчук В. Г. Гистологические изменения ультраструктуры миокарда старых крыс при стресс-индуцированной артериальной гипертензии. *Стратегії профілактики неінфекційних хвороб та шляхи їх реалізації: від постулатів минулого в майбутнє: матеріали наук.-практ. конф. за участю міжнар. спеціалістів, Харків, 4 листопада 2016 р.* Харків, 2016. С. 10.

35. **Бабийчук Л.В.**, Коваль С.Н. Уровень конечных продуктов NO в сыворотке крови старых крыс на фоне стресс-индуцированной АГ. *Медикаментозна та не медикаментозна профілактика неінфекційних захворювань: погляд в майбутнє (присвячена пам'яті академіку Л.Т. Малої: матеріали наук.-практ. конф. за уч. міжнар. спеціалістів, Харків 20 квітня 2017р.* Харків, 2017. С. 13.

АНОТАЦІЯ

Бабийчук Л.В. Вплив кріоконсервованої кордової крові на структурно-функціональний стан серцево-судинної системи у тварин із експериментальною гіпертензією (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця 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, 2017.

Дисертацію присвячено вивченню впливу кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові (кЯВК КК) на структурно-функціональний стан серцево-судинної системи у тварин різних вікових груп на моделі стрес-індукованої артеріальної гіпертензії (АГ).

Встановлено, що кріоконсервування ЯВК КК, у тому числі й стовбурових гемопоетичних, під захистом кріопротектора ДМСО в 5 %-й концентрації, після виділення в поліглюкіні дозволяє зберегти більше 80 % CD45⁺-клітин і більше 90 % CD34⁺- клітин у життєздатному стані.

Показано, що після введення щуром із АГ кЯВК КК активується вегетативна нервова система і гуморальна ланка регуляції, відновлюється трофіка тканин і судин міокарда, нормалізується ліпідний гомеостаз, рівень тиреоїдних гормонів і нітритів у сироватці крові та показники артеріального тиску.

Ключові слова: ядровмісні клітини кордової крові, кріоконсервування, артеріальна гіпертензія, артеріальний тиск.

АННОТАЦИЯ

Бабийчук Л.В. Влияние криоконсервированной кордовой крови на структурно-функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у животных с экспериментальной гипертензией (экспериментальное исследование). – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.35 – «криомедицина». – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2017.

Диссертационная работа посвящена изучению влияния криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови (кЯСК КК) на структурно-функциональное состояние сердечно-сосудистой системы (ССС) у животных различных возрастных групп на модели стресс-индуцированной артериальной гипертензии (АГ).

В результате проведенных исследований обоснована эффективность применения кЯСК КК с целью восстановления структурно-функциональных нарушений ССС у крыс с экспериментальной гипертензией.

Установлено, что криоконсервирование ЯСК КК, в том числе и стволовых гемопоэтических, под защитой криопротектора ДМСО в 5 %-й концентрации, после выделения в полиглобине позволяет сохранить более 80 % CD45⁺-клеток и более 90 % CD34⁺-клеток в жизнеспособном состоянии. Колониеобразующая активность клеток после криоконсервирования данным методом была на достаточно высоком уровне и не отличалась от контрольных значений, что свидетельствует о функциональной полноценности клеток. Изменения популяционного состава ЯСК КК до и после криоконсервирования свидетельствуют о высокой криоустойчивости лимфоцитов и моноцитов (жизнеспособность более 95 %), а основное уменьшение основного количества и жизнеспособности общей популяции ЯСК КК происходит за счёт гранулоцитов.

Использование у экспериментальных животных модифицированной методики моделирования, стресс-индуцированной АГ обеспечивает стойкое повышение показателей артериального давления (АД), развитие выраженных структурных и ультраструктурных изменений ССС, нарушений вегетативной регуляции сердечного ритма, липидного профиля, тиреоидного статуса и активности оксида азота.

При сравнительном анализе эффективности применения кЯСК КК и плазмы кордовой крови установлено, что введение кЯСК КК оказывает продолжительное позитивное влияние на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма, тем самым существенно повышая функциональные возможности организма животных независимо от возраста.

Показано, что развитие АГ у молодых и старых животных приводит к резкому снижению всех исследуемых параметров variability кровообращения. По мере прогрессирования патологии вегетативное обеспечение сердечной деятельности осуществляется за счет перехода регуляции на медленный гуморально-метаболический уровень. После введения кЯСК КК активируется тонус вегетативной нервной системы и гуморального звена регуляции, нормализуются показатели АД.

При гистологическом и электронно-микроскопическом исследовании кардиомиоцитов и эндотелиоцитов миокарда молодых и старых крыс с АГ

обнаруживаются признаки развития дистрофических и деструктивных изменений мышечных волокон и их органелл. После использования кЯСК КК улучшается трофика тканей, исчезают дистрофические и деструктивные нарушения как в результате процесса неоангиогенеза, так и за счёт активации репаративных процессов.

Показано, что у животных при стресс-индуцированной АГ происходит смещение липидного профиля в сторону атерогенности, наблюдаются нарушения тиреоидного статуса, снижается активность оксида азота. Введение кЯСК КК сопровождается коррекцией липидного гомеостаза, нормализацией уровня тиреоидных гормонов и нитритов в сыворотке крови, что способствует восстановлению дисбаланса системы локальной регуляции гомеостаза и сосудистого тонуса.

Ключевые слова: ядросодержащие клетки кордовой крови, криоконсервирование, артериальная гипертензия, артериальное давление.

ANNOTATION

Babiychuk L.V. Effect of cryopreserved cord blood on structural and functional state of cardiovascular system in animals with experimental hypertension (experimental study). – The qualified scientific work on the right of the manuscript.

Thesis for a candidate degree in medical sciences, specialty 14.01.35 – "cryomedicine". – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2017.

The dissertation is devoted to the study of an influence of cryopreserved cord blood nucleated cells (CBNCs) on structural and functional state of the cardiovascular system in animals of various age groups in the model of stress-induced arterial hypertension (AH).

It has been established that the cryopreservation of the CBNCs, including the stem hemopoietic ones, under the protection of DMSO cryoprotectant at 5 % concentration, after isolation in polyglycine, allowed to preserve more than 80 % of the CD45⁺ cells and more than 90 % of the CD34⁺ cells in a viable state.

It has been demonstrated that after introduction of cryopreserved CBNCs to the rats, the vegetative nervous system and humoral link of regulation were activated, the trophy of the myocardium tissues and vessels was restored, lipid homeostasis, e level of thyroid hormones and nitrites in the serum and the blood pressure index were normalized.

Key words: cord blood nucleated cells, cryopreservation, arterial hypertension, arterial pressure.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія; **АТ** – артеріальний тиск; **ВСР** – варіабельність серцевого ритму; **ГСК** – гемопоетичні ствові клітини – попередники; **КК** – кордова кров; **кЯВК КК** – кріоконсервовані ядровмісні клітини кордової крові; **ТР** – загальна спектральна потужність нейрогуморальної регуляції.