DOI: 10.18454/IRJ.2016.52.037

Свидко Е.Н.[1], Рязанцев В.В.[2], Бабийчук Л.А.[3], Дёмин Ю.А. [4]
[1]Врач-офтальмолог ММЦ Офтальмика, [2] Кандидат биологических наук, [3]Доктор биологических наук,
[3]Профессор, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, доктор медицинских наук,
[4]Профессор, Харьковская медицинская академия последипломного образования

ХАРАКТЕР НАКОПЛЕНИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ ТКАНЯХ ГЛАЗА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ (КЯККЧ)

Аннотация

В данной работе было исследовано содержание трансформирующего фактора роста TGF-β1 и нейротрофического фактора мозга BDNF в зоне лимба роговицы после введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови (кЯККЧ) в экспериментальной модели лимбальной недостаточности роговицы (ЛНР). Криоконсервирование ЯККЧ проводили с высоким или с существенно сниженным содержанием декстрана. Было показано, что независимо от метода замораживания при введении кЯККЧ животным с индукцией ЛНР в ткани роговицы наблюдается достаточно высокое содержание BDNF и TGF-1b, что способствует улучшению регенерации клеток лимба, эпителия и стромы роговицы глаза.

Ключевые слова: криоконсервирование, лимбальная недостаточность роговицы, ядросодержащие клетки кордовой крови, ростовые факторы.

Svidko E.N.[1], Ryazantsev V.V.[2], Babijchuk L.A.[3], Dyomin Yu.A.[4]
[1]Ophthalmologist, International Medical Centre Oftalmika, [2]PhD in Biology, [3] PhD in Biology, Professor,
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, [4]MD, Professor,
Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education.

ACCUMULATION OF GROWTH FACTORS IN THE EYE TISSUES AFTER INFILTRATION OF CRYOPRESERVED CORD BLOOD NUCLEATED CELLS (CCBNC)

Abstract

In this research level of the transforming growth factor TGF-β1 and brain-derived neurotrophic factor BDNF in limbus after the infiltration of cryopreserved cord blood nucleated cells (CCBNC) in experimental model of limbal stem cells deficiency (LSCD) was investigated. Cryopreservation was performed with a high or significantly reduced level of dextran. It was shown that, regardless of the method of cryopreservation after infiltration of CCBNC in experimental LSCD, sufficiently high level of BDNF and TGF-1b was observed. This contributes improvement of limbal cells regeneration, epithelium and corneal stroma.

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

Многие заболевания органа зрения человека, особенно хронические, характеризуются вовлечением в патологический процесс зоны лимба [8]. При этом наблюдается как снижение количества стволовых лимбальных клеток, способных к делению, так и изменение состояния микроокружения клеток лимба - специфических ростовых регуляторов, таких как фактор роста эпителия (EGF), трансформирующий ростовой фактор (TGF), различные нейротрофические ростовые факторы. В современной офтальмологии интенсивно развивается новое направление - клеточная терапия с применением ЯККЧ [1, 9]. Все чаще для лечения многих патологий эффективно используется ЯККЧ как источник гемопоэтических стволовых клеток, а также благодаря содержанию в ней большого количества биологически активных веществ и ростовых факторов [7, 10]. Одним из наиболее эффективных методов длительного хранения ЯККЧ в полноценном состоянии является криоконсервирование [1, 4].

Традиционно используемым криопротектором является ДМСО, в данном случае с неизбежной примесью декстрана (в виде фармпрепарата полиглюкин). Однако, известно, что декстран имеет некоторые отрицательные качества. При его введении может возникать сенсибилизация и аллергические реакции. Известно, что декстран используют в качестве пролонгаторов в глазных каплях, так как полисахариды способны делать структуру препарата более вязкой, а значит дольше сохранятся на роговице. Вследствие этого препарат кЯККЧ с декстраном трудно набрать в шприц, а выполнение инфильтрации роговицы требует определенных навыков. Также декстран вызывает отёк и утолщение роговицы. Это продлевает восстановительный период после введения. Полисахариды, и в частности декстран - хорошая среда для размножения бактерий. Потому повышается риск воспалительных заболеваний.

Цель работы — оценить характер содержания ростовых факторов (TGF-β1 и BDNF) в зоне лимба у кролей с индукцией ЛНР после введения кЯККЧ, криоконсервированных разными методами.

Экспериментальная работа была выполнена на кролях в возрасте 6 месяцев породы Шиншилла весом 2,0-2,5 кг (n=45). Для формирования экспериментальной ЛНР животным на область лимба выполняли аппликацию 0,04% раствора митомицина-С (ММС) в течение 3-х минут [4]. Из эксперимента животных выводили под наркозом путем воздушной эмболии через ушную вену. Исследования проводились согласно «Общим этическим принципам экспериментов на животных» (29.09.01), которые согласовываются с положением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Использовали препарат «Криоцелл-гемоклетки» после его размораживания, содержащий 5% ДМСО и 3,6% декстрана (режим 1). В части экспериментов использовали такой же препарат, содержащий сниженное количество декстрана (не более 0,4%), который при традиционном способе выделения ЯККЧ из кордовой крови находится в среде замораживания в концентрации 3,6% (режим 2) [2, 6]. В обоих случаях при криоконсервировании применяли 2-х этапный режим замораживания согласно методу [2, 6].

Введение кЯКККЧ проводили в зону лимба по 8 меридианам в объеме 0,2 мл в концентрации 500тыс клеток в один глаз. Все кролики разделены на 3 группы: 1 - здоровые с введением кЯКККЧ, 2 - ЛНР с введением кЯКККЧ (режим криоконсервирования 2), 3 - ЛНР с введением кККК (режим криоконсервирования 1). Анализ проводимой терапии у кролей осуществляли на 1, 3, 7, 14 и 21 сутки.

Для исследования концентрации ростовых факторов готовили осветлённый гомогенат из роговицы кроля, освобожденный центрифугированием от измельченных остатков ткани и клеток. Для его получения брали 50 мг ткани роговицы глаза, измельчали в пробирке «Эппендорф» объёмом 1,5 мл с помощью микро-гомогенизатора Поттера в физиологическом растворе на фосфатном буфере с pH 7,4 с добавлением 1 мМоля ингибитора протеаз фенилметилсульфонилфлуорида. Соотношение ткань – раствор составляло 1:10. После получения гомогената его осветляли центрифугированием при 3000 g в течение 10 минут. Надосадок собирали в отдельную пробирку для дальнейшего измерения содержания BDNF и TGF-1b.

Для исследования концентрации ростовых факторов BDNF и TGF-1b использовали высокочувствительные тест-системы, в частности, для измерения TGF-1b тест-систему производства “DRG”, с чувствительностью 2 пг/мл, для измерения BDNF тест-систему “R&D Systems” Quantikine, с чувствительностью 20 пг/мл. Важным является использование нами тест-систем для измерения человеческих клеточных факторов роста, а не лабораторного животного, в данном случае кроля, так как при введении клеточного препарата в орган зрения использовали препарат из кордовой крови человека. Все измерения проводили согласно инструкции производителя, методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием полуавтоматического спектрофотометра для 96-луночных планшетов с вертикальным лучом StatFax 2400 (США). Из пробирки осветленного гомогената дозатором брали 0,1 мл и переносили в лунки планшета, в котором в дальнейшем проводили реакцию связывания TGF-1b и BDNF с пришитыми на дне лунок антителами, специфически взаимодействующими по принципу антиген-антитело. В дальнейшем проводили добавление вторичных антител и запускали ферментативную реакцию, которая давала окрашенный продукт. Измерение этого окрашенного продукта реакции проводили по данным предварительно настроенной калибровочной кривой.

Статистическую обработку полученных результатов проводили параметрическим методом с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрическим методом Манна-Уитни.

После введения в зону лимба суспензии ЯКККЧ у кролей групп 2 и 3 наблюдали повышение содержания в ткани роговицы ростовых факторов BDNF, TGF-1b. по сравнению с контрольной группой 1 (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание факторов роста в роговице кроликов после введения ЯКККЧ

Срок после введения ККЧ, сутки	Содержание TGF-1β пг/мл			Содержание BDNF пг/мл		
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3
1	2,3±0,2	$6,8\pm0,2^{1,3}$	$7,5\pm0,5^{1,2}$	4,1±0,1	$11,9\pm0,2^{1,3}$	$11,7\pm0,2^{1,2}$
3	2,9±0,1	$7,1\pm0,1^{1,3}$	$8,2\pm0,2^{1,2}$	5,3±0,3	$18\pm0,1^{1,3}$	$17,3\pm0,3^{1,2}$
7	3,8±0,1	$9,4\pm0,3^{1,3}$	$11\pm0,1^{1,2}$	6,8±0,2	$23,2\pm0,2^{1,3}$	$25,4\pm0,2^{1,2}$
14	4,1±0,2	$18,6\pm0,2^{1,3}$	$19,1\pm0,1^{1,2}$	8,2±0,2	$29,2\pm0,3^{1,3}$	$32,2\pm0,2^{1,2}$
21	4,4±0,1	$19,7\pm0,2^{1,3}$	$20,7\pm0,3^{1,2}$	9,5±0,1	$36,1\pm0,1^{1,3}$	$42,8\pm0,2^{1,2}$

Очевидно, что такое нарастание содержания ФР в первый период после размораживания и введения ЯКККЧ в роговицу связано с повышенной проницаемостью клеток, подвергнутых замораживанию. В дальнейшем, в срок наблюдения до 21 суток от момента введения в роговицу ЯКККЧ, степень нарастания концентрации ФР по сравнению с контрольной группой увеличивалась в 3 раза для BDNF и в 4 раза для TGF-1b.

Поскольку, нами отмечено присутствие ЯКККЧ в роговице в этот срок наблюдения, возможно по сравнению с контрольной группой наличие факторов роста в ткани глаза можно связать с ЯКККЧ. Исходя из полученных данных можно предположить, что введение ЯКККЧ независимо от метода криоконсервирования К1 или К2 способствуют поступлению ФК, необходимых для регенерации поврежденного лимба и роговицы. Очевидно, ЯКККЧ, введенные в зону лимба, поставляют биологически активные вещества (BDNF, TGF-1b), причем эффект более выражен при развитии такой патологии, как ЛНР. Характер накопления ФК в тканях роговицы не отличается при введении ЯКККЧ, криоконсервированных в режиме 1 (К1), так и в режиме 2 (К2). Количество биологически активных веществ, обнаруживаемых в зоне лимба в срок до 21 суток от момента введения повышается с увеличением времени пребывания ЯКККЧ в роговице у кролей, и существенно выше на 21-е сутки, чем у кролей с развитием ЛНР. Таким образом, снижение содержания декстрана в среде замораживания не приводит к существенному снижению жизнеспособности ККЧ после криоконсервирования по сравнению со стандартным методом получения и замораживания в среде с декстраном (К1).

Поддержание постоянства любой эпителиальной структуры, в том числе роговичного эпителия, обеспечивается популяцией СК, которые представляют собой уникальный источник регенерации клеток, как в физиологических условиях, так и при различных заболеваниях или травмах глаза [11]. В случае тотальной ЛНР необходима пересадка ауто- либо аллогенных СК. В настоящее время многие исследования направлены на выяснение механизмов регуляции процессов дифференцировки стволовых клеток. [12].

Можно предположить, что в этом случае происходит активация клеток эпителия роговицы и СК лимба вследствие влияния на них биологически активных веществ ЯКККЧ - BDNF и TGF-1β. Известно, что BDNF принадлежит к классу цитокинов, семейству ФР и подсемейству нейротрофинов и обладает выраженными нейрозащитными свойствами, угнетает клеточный апоптоз, препятствует гибели нейронов и стимулирует рост холинергических нервных волокон [3]. При экспериментальной ЛНР происходит резкое снижение содержания BDNF во внутриглазных

структурах, поэтому важна компенсация его содержания, которую способны обеспечить, по всей видимости, ЯККЧ. TGF-1β оказывает множественные влияния на различные типы клеток и участвует в регуляции роста клеток, их дифференцировке и апоптозе, а также в модуляции ИС, способствует заживлению ран. Наиболее важной следует считать его участие в регенерации тканей. Установлено, что TGF-1β активирует хемотаксис воспалительных клеток и синтез экстрацеллюлярного матрикса [5].

Выводы: Уже с первых суток после введения кЯККЧ обеспечивают цитопротекцию и регенерацию клеток роговицы и лимба, в независимости от метода криоконсервирования, сохраняют свою целостность и после введения в орган зрения имеют нарастающий характер нарабатывания BDNF, TGF-1b, с постепенным возрастанием их концентрации до 21-х суток. Повышение секреции ростовых факторов после введения кЯККЧ животным в экспериментальной модели ЛНР ускоряют процессы регенерации клеток лимба, эпителия и стромы роговицы. Полученные результаты экспериментального исследования позволяют рекомендовать применение кЯККЧ в широкой офтальмологической практике при лечении ЛНР.

Список литературы / References

1. Абдулкадыров К.М. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопоэтического потенциала / К.М. Абдулкадыров, Н.А. Романенко // Трансфузиология.– 2003.– Т.4, №1.– С. 44-46.

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

3. Головко А.И.. Нейротрофические факторы головного мозга. Нейрохимические и наркологические аспекты. // Нейрохимия.– 2008.– Т.25.-№4.– С. 261-271

4. Милюдин Е.С. Экспериментальная модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия. Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. 2006. №9 (49). – С. 219 - 226

5. Никитин Н.А,, Ш.Р. Кузбеков. Роль TGFβ в офтальмологии.// Цитокины и воспаление.– 2009. Т. 8.– № 1. – С. 3-9

6. Пат. 92227 Україна, МПК A 01 N 1/02. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клггин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних клігин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна та ін.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобюлогн і кріомедицини НАН України. – №200814009; заявл. 05.12.2008; опубл. 11.10.2010, Бюл.№19, 2010.

7. Broxmeyer H.E, Kurtzberg J., Gluckman E. et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulation cells in human clinical transplantation// Criobiology.– 1995.–Vol.32, №6.– P. 511-515

8. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. Surv Ophthalmol. 2000 – №44(5) – P. 415-425.

9. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation// Experimental hematology.– 2000.–Vol.28.–Pt.11.–P.1197-1205

10. Tseng SCG.Concept and application of limbal stem cells // Eye. – 1989.—№57 – P. 201-209.

11. Lavker, R. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle // Experimental eye research. – 2004. – Vol. 78.– P. 433-446.

12. Miri A, Al-Deiri B, Dua HS. Long-term outcomes of autolimbal and allolimbal transplants. Ophthalmology. – 2010. – №117(6). – P. 1207-1213.

Список литературы латинскими символами / References in Roman script

1. Abdulkadyrov K.M. Zagotovka placentarnoj krovi. Osobennosti ee kletochnogo sostava i gemopojeticheskogo potenciala [Harvesting placental blood. Features of its cellular composition and hematopoietic potential] / K.M. Abdulkadyrov, N.A. Romanenko // Transfuziologija.– 2003.– T.4, №1.– S. 44-46. [in Russian]

2. Babijchuk L.A., Grishhenko V.I., Zubov P.M., Zubova O.L., Rjazancev V.V., Babijchuk L.V., Kudokoceva O.V., Ljubchich S.A. Strukturno-funkcional'noe sostojanie i zhiznesposobnost' jadrosoderzhashhih kletok pupovinnoj krovi posle kriokonservirovanija [Structural and functional condition and viability of nucleated cord blood cells after cryopreservation] // Kletochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija [Cellular Transplantation and Tissue engeneering].– 2010. – №3. – S. 77-81[in Russian]

3. Golovko A.I. Nejrotroficheskie faktory golovnogo mozga. Nejrohimicheskie i narkologicheskie aspekty [Brain-derived neurotrophic factors. The neurochemical and substance abuse issues] // Nejrohimija.– 2008.– T.25.-№4.– C. 261-271. [in Russian]

4. Miljudin E.S. Jeksperimental'naja model' nedostatochnosti regional'nyh stvolovyh kletok rogovichnogo jepitelija. Vestnik SamGU – Estestvennonauchnaja serija [Experimental model of regional failure of stem cells of the corneal epithelium. Vestnik of SSU - natural science series]. 2006. №9 (49). – S. 219 – 226. [in Russian]

5. Nikitin N.A,, Sh.R. Kuzbekov. Rol' TGFβ v oftal'mologii [The role of TGFβ in ophthalmology]// Citokiny i vospalenie.– 2009. T. 8.– № 1. – S. 3-9. [in Russian]

6. Pat. 92227 Ukraïna, MPK A 01 N 1/02. Sposib kriokonservuvannja jadrovmisnih klggin kordovoï krovi, u tomu chisli stovburovih gemopoetichnih kligin / L.O. Babijchuk, V.I. Grishhenko, T.M. Gurina ta in.; zajavnik ta patentovlasnik Institut problem kriobjulogn i kriomedicini NAN Ukraïni [Stalemate. 92227 Ukraine, IPC A 01 N 1/02. Yadrovmisnyh klhhyn cryopreservation of cord blood, including hematopoietic stem klihyn / LA Babiychuk VI Gryshchenko, TN Gurin and others .; The applicant and patentee Institute of Problems kriobyulohn i Cryomedicine Ukraine]. – №200814009; zajavl. 05.12.2008; opubl. 11.10.2010, Bjul.№19, 2010.

7. Broxmeyer H.E, Kurtzberg J., Gluckman E. et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulation cells in human clinical transplantation// Criobiology.– 1995.–Vol.32, №6.– P. 511-515

8. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. Surv Ophthalmol. 2000 – №44(5) – P. 415-425.

9. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation// Experimental hematology.– 2000.–Vol.28.–Pt.11.–P.1197-1205

10. Tseng SCG.Concept and application of limbal stem cells // Eye. – 1989.—№57 – P. 201-209.

11. Lavker, R. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle // Experimental eye research. – 2004. – Vol. 78.– P. 433-446.
12. Miri A, Al-Deiri B, Dua HS. Long-term outcomes of autolimbal and allolimbal transplants. Ophthalmology. – 2010. – №117(6). – P. 1207-1213.

DOI: 10.18454/IRJ.2016.52.176

Федотова Е.В.[1], Попов В.А.[2], Малявский И.Ю.[3]
[1]Кандидат медицинских наук, доцент, Северный государственный медицинский университет.
[2]доктор медицинских наук, профессор, Северный государственный медицинский университет.
[3]патологоанатом, заведующий патолого анатомическим отделением ГБУЗ АО « Архангельская областная клиническая больница»

АТЕРОСКЛЕРОЗ ЧРЕВНОЙ АРТЕРИИ В ПОПУЛЯЦИИ ЖИТЕЛЕЙ ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРА РОССИИ

Аннотация

Атеросклеротическое поражение висцеральных ветвей является серьезной проблемой в плане клинических проявлений, с высоким риском летального исхода. Целью настоящего исследования явилось изучение распространенности, стадийности, патологической анатомии атеросклероза непарных висцеральных ветвей брюшного отдела аорты. В статье отражены результаты по чревной артерии, она наиболее часто поражается атеросклерозом из непарных висцеральных артерий - 52,3%.

Ключевые слова: чревный ствол, атеросклероз, возвышающиеся поражения.

Fedotova E.V.[1], Popov V.A.[2], Malyavskii I.Y.[3]
[1]MD, Associate professor, Public budgetary educational institution of higher education "Northern state medical university" Arkhangelsk.
[2]MD, Professor, Public budgetary educational institution of higher education "Northern state medical university" Arkhangelsk.
[3]patologanatom, head of Pathology anatomic compartment, State budgetary institution of health care of the Arkhangelsk region "Arkhangelsk regional clinical hospital".

CELIAC ARTERY ATHEROSCLEROSIS IN THE POPULATION OF RESIDENTS IN RUSSIA'S EUROPEAN NORTH

Abstract

Atherosclerotic visceral branches is a serious problem in terms of clinical manifestations, with a high risk of death. The aim of this study was to examine the prevalence, staging, pathological anatomy atherosclerosis unpaired visceral branches of the abdominal aorta. The article reflects results for celiac artery, it is most often affected by atherosclerosis of the unpaired visceral arteries-52.3%.

Keywords: celiac artery, atherosclerosis, towering defeat.

Атеросклеротическое поражение аорты и ее висцеральных ветвей является очень актуальной проблемой вследствие своих клинических проявлений и осложнений, с высоким риском летального исхода. [1,2,4,5] Имеющиеся в литературных источниках данные об атеросклеротическом поражении чревного ствола и висцеральных ветвей аорты указывают на разный процент встречаемости данной патологии, но во всех случаях он достаточно высокий [1,3]. Все брыжеечные сосуды берут свое начало от брюшного отдела аорты. Сразу ниже аортального отверстия диафрагмы от аорты на уровне XII грудного позвонка отходит чревная артерии (чревный ствол, truncus celiacus, ЧС), которая делится на три крупные ветви. Атеросклероз чревного ствола, по данным литературных источников встречается в 45,3%-88,0% [1]. Клинические проявления нарушения проходимости висцеральных артерий определяют развитие хронической абдоминальной ишемии. Клиника данного заболевания многообразна и зависит от того, какой из непарных висцеральных сосудов скомпрометирован больше всего. Так, при поражении чревного ствола ведущим симптомом является приступообразная боль в животе, возникающая после пищевой или физической нагрузки, в ряде случаев боль носит постоянный характер. В нашем регионе, как и по России в целом, показатели заболеваемости и смертности от различных проявлений атеросклероза являются одними из самых высоких [2,6]. Целью настоящего исследования явилось изучение распространенности, стадийности, патологической анатомии атеросклероза чревного ствола в популяции жителей Европейского Севера России.

Материалы и методы:

Оценен 101 нативный материал на предмет распространенности и выраженности атеросклеротических изменений.

Препарат: брюшной отдел аорты с непарными висцеральными ветвями, границы сегментов: 1) чревный ствол от устья до бифуркации, 2) верхняя брыжеечная артерия – пять сантиметров от устья, 3) нижняя брыжеечная артерия первые четыре сантиметра от устья. Оценка атеросклеротических поражений производилась визуально планометрическим унифицированным методом, предложенным экспертами ВОЗ.

Исследование выполнено на базе патологоанатомического отделения ГБУЗ АО «АОКБ».

Стадии атеросклеротического поражения общеизвестны:

I - имеются только липидные пятна

II- фиброзные бляшки

III – осложненные фиброзные бляшки

IV- фиброзные бляшки и кальциноз [2,5]