
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика. Адреса: м. Київ, вул. Дорогожицька, 9; тел.: (044)-206-73-30.

Тимченко Олександр Геннадійович — кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри промислової, клінічної фармації та клінічної фармакології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика. Адреса: м. Київ, вул. Дорогожицька, 9; тел.: (044)-206-73-30.

Буцька Вікторія Євгенівна — кандидат фармацевтичних наук, доцент, доцент кафедри промислової, клінічної фармації та клінічної фармакології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика. Адреса: м. Київ, вул. Дорогожицька, 9; тел.: (044)-206-73-30.

Макарчук Олександра Олександрівна — асистент кафедри промислової, клінічної фармації та клінічної фармакології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика. Адреса: м. Київ, вул. Дорогожицька, 9; тел.: (044)-206-73-30.

УДК:617.7–007.681:616.8]-018:576.3–092.4/9

КЛІТИННА ТЕРАПІЯ ГЛАУКОМНОЇ ОПТИЧНОЇ НЕЙРОПАТІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ (КОРОТКОСТРОКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ)

А. І. Яковець

**Національна медична академія післядипломної освіти
імені П. Л. Шупика, м. Київ**

Вступ. Проблема розробки нових ефективних методів лікування глаукомної оптичної нейропатії являється однією з найбільш актуальних в сучасній офтальмології.

Мета. Дослідити ефективність клітинної терапії з використанням постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня (МСК-ПНГ) шляхом використання різних способів введення при експериментальній глаукомі.

Матеріали та методи. Проведено моделювання глаукоми на щурах Wistar шляхом внутрішньочеревного введення 0,18 % розчину адреналіну гідротартрату в дозі, починаючи з 10 мкг, доводячи до 15 мкг на 100 г маси. Трансплантацію МСК-ПНГ здійснено наступними

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

способами: внутрішньовенно введено 5 млн клітин; ретро- і парабульбарно — по 0,5 млн клітин. Гістоморфометричний аналіз сітківки проводили на забарвлених гематоксилін-еозином зрізах товщиною 5 мкм, через місяць після введення МСК-ПНГ.

Результати. Трансплантація МСК-ПНГ викликала позитивні морфологічні зміни різного ступеня при всіх способах доставки. Так, внутрішньовенне введення зменшувало набряк всіх шарів сітківки, але мало сприяло відновленню цитоархітектоніки шарів сітківки. Парабульбарне введення МСК-ПНГ приводило до зменшення набряку і відновлення цитоархітектоніки шарів, яке було найбільш виражене в шарі гангліозних клітин і у внутрішньому шарі сітківки. При ретробульбарному введенні МСК-ПНГ зменшення набряку і відновлення цитоархітектоніки шарів було найбільш виражено. У порівнянні з моделлю, статистично достовірно збільшувалася кількість ядер у внутрішньому і зовнішньому ядерних шарах, хоча їх кількість залишалася нижче, ніж у інтактних тварин.

Висновки. За результатами дослідження позитивний ефект трансплантації МСК-ПНГ при адреналіновій моделі глаукоми був найбільш виражений при ретробульбарному введенні клітин. Необхідні подальші дослідження механізмів впливу трансплантованих МСК-ПНГ на відновлення структури сітківки.

Ключові слова: глаукомна оптична нейропатія; мультипотентні стовбурові клітини, модель глаукоми.

Вступ. Глаукома — хронічне, мультифакторне нейродегенеративне захворювання, в процесі якого виникає загибель гангліозних клітин сітківки та розвивається прогресуюча оптична нейропатія — одне з найбільш інвалідизуючих захворювань серед головних причин слабкозорості та сліпоти [4].

В останні роки наукові знання про глаукому, які мають прикладне значення, суттєво розширились. Отримані нові дані про закономірності гідродинаміки та біомеханіки, механізми виникнення та прогресування глаукоми, її патоморфологічні та клінічні форми. На цій основі розроблені ефективні методи діагностики та лікування [1]. Однак на даний час залишається багато неясних і суперечливих положень, особливо важлива проблема лікування розвинутих та поширених стадій захворювання, коли компенсаторні можливості практично повністю вичерпані і зростає ймовірність незворотних порушень зорових функцій.

Сучасною наукою активно проводиться чимало експериментальних досліджень та показано позитивний ефект при використанні мультипотентних стовбурових клітин в офтальмології [2;7]. Досягнення в області регенеративної медицини і клітинної терапії ґрунтуються на унікальних властивостях стовбурових клітин, включаючи здатність до самооновлення і можливість диференціювання в специфічні види клітин, що служить підставою їх застосування для регенерації пошкоджених тканин [8;9]. Перспективи клінічного застосування стовбурових клітин практично безмежні. Завдяки унікальним біологічним особливостям цього типу клітин, вони застосовуються при лікуванні різних дегенеративних захворювань. [5; 10].

Враховуючи неухильне зростання захворюваності, прогресуюче погіршення та втрату зорових функцій, що призводить до втрати працездатності та інвалідності, глаукому відносять до соціально-значущих захворювань. За результатами епідеміологічних досліджень, глаукома практично у всіх регіонах світу серед причин сліпоти посідає друге місце, що підкреслює її соціальну значущість як одного з найбільш інвалідизуючих захворювань. За результатами досліджень, ймовірність настання сліпоти на одне око через 20 років після виникнення захворювання і початку лікування становить 27 %, а на обидва ока — 9 % [6]. Саме тому проблема розробки нових ефективних методів лікування глаукоми являється однією з найбільш актуальних в сучасній офтальмології. Перспективним напрямком в лікуванні глаукоми являється клітинна терапія з використанням стовбурових клітин, але важливим аспектом є правильний і адекватний вибір клітинного типу. У нашому дослідженні ми зупинилися на мультипотентних стовбурових клітинах-похідних нервового гребня (МСК-ПНГ). Нервовий гребінь (НГ) — транзиторна структура в ході ембріонального розвитку хребетних, яка в дорослому організмі дає широке розмаїття різних диференційованих клітинних типів — нейрони і глія периферичної нервової системи, меланоцити шкіри, сполучна, хрящова і кісткова тканина в області голови та шиї, деякі ендокринні клітини і т.д. Крім того, в ряді робіт показано, що як *in vitro*, так і після трансплантації *in vivo* МСК-ПНГ здатні трансдиференціювати в клітинні типи, характерні для ЦНС. В останні роки постнатальні МСК-ПНГ були ідентифіковані в цілому ряді тканин і органів дорослих ссавців, включаючи людину. При цьому МСК-ПНГ демонструє 2 основні властивості стовбурових клітин (СК)– здатність до самовідновлення і мультилінійної

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

диференціації [3]. Тому, метою нашого дослідження було дослідити ефективність застосування мультипотентних стовбурових клітин в лікуванні експериментальної глаукоми при різних способах введення.

Мета дослідження. Дослідити ефективність клітинної терапії з використанням постнатальних МСК-ПНГ в лікуванні індукованої адреналіновим стресом глаукоми при різних способах доставки.

Матеріали і методи. Моделювання глаукоми проводили на щурах Wistar (10–12 міс., самці) шляхом внутрішньочеревинного введення 0,18 % розчину адреналіну гідротартрату в дозі, починаючи з 10 мкг, доводячи до 15 мкг на 100 г маси. Було проведено 20 ін'єкцій за 6 тижнів, в середньому по 3 ін'єкції в тиждень. Через кожні 5 ін'єкцій доза введеного адреналіну збільшувалась. Вимірювання внутрішньоочного тиску (ВОТ) проводили аппланаційним тонометром Topolab. МСК-ПНГ отримували з волосяного фолікула вібрис і культивували за оригінальною методикою. МСК-ПНГ були охарактеризовані за допомогою імуноцитохімії, проточної цитометрії та за здатністю до спрямованої диференціації. Трансплантацію МСК-ПНГ здійснювали наступними способами: внутрішньовенно вводили 5 млн клітин; ретро- і парабульбарно — по 0,5 млн клітин. Гістоморфометричний аналіз сітківки та зорового нерва проводили на забарвлених гематоксилін-еозином зрізах товщиною 5 мкм.

Результати. МСК-ПНГ мали фенотип $nestin^{+}p75^{+} Sox10^{+}cytokeratin$. ВОТ у щурів до початку моделювання глаукоми становив 7–8 мм. рт. ст. Після моделювання глаукоми — 20–22 мм. рт. ст. Через місяць після моделювання глаукоми спостерігали характерні для глаукомної оптичної нейропатії дегенеративно-дистрофічні зміни: набряк зорового нерва і всіх шарів сітківки, дегенерацію аксонів в шарі нервових волокон і його часткове відшарування від шару гангліозних клітин; апоптоз і некроз клітин в шарі гангліозних клітин; розпушення і збільшення товщини внутрішнього сітчастого шару, поява в ньому ядер клітин; витончення, розриви і поява ядер клітин в зовнішньому сітчастому шарі; порушення цитоархітекτονіки внутрішнього і зовнішнього ядерних шарів; зменшення кількості та поява пікнотичних ядер в цих шарах; збільшення товщини фоторецепторного шару. Ці зміни були стабільні і спостерігалися при дослідженні через 3 місяці.

Трансплантація МСК-ПНГ викликала позитивні морфологічні зміни різного ступеня при всіх способах доставки. Так, внутріш-

ньовенне введення зменшувало набряк зорового нерва і всіх шарів сітківки, але мало сприяло відновленню цитоархітекτονіки шарів сітківки. Парабульбарне введення МСК-ПНГ приводило до зменшення набряку і відновлення цитоархітекτονіки шарів, найбільш виражене в шарі гангліозних клітин і у внутрішньому шарі сітківки. У зовнішньому ядерному і фоторецепторних шарах зберігався значний набряк.

При ретробульбарному введенні МСК-ПНГ зменшення набряку і відновлення цитоархітекτονіки шарів було найбільш виражено.

У порівнянні з моделлю, статистично достовірно збільшувалася кількість ядер у внутрішньому і зовнішньому ядерних шарах, хоча їх кількість залишалася нижче, ніж у інтактних тварин.

Висновки. При проведенні експерименту спостерігався позитивний ефект трансплантації МСК-ПНГ при адреналіновій моделі глаукоми, який був найбільш виражений при ретробульбарному введенні клітин. Необхідні подальші дослідження механізмів впливу трансплантованих МСК-ПНГ на відновлення сітківки та зорового нерва.

ЛІТЕРАТУРА

1. Абизгильдина Г. Ш. Опыт комбинированного лечения глаукомной оптической нейропатии/ Г. Ш. Абизгильдина // Медицинский вестник Башкортостана.— 2014.— Том 9, № 2.— С. 15–18.
2. Борзенко С. А. Клеточная нейропротекция как современный подход к лечению оптических нейропатий / С. А. Борзенко, М. Х. Хубецова, И. Н. Сабурин [и др.] // Регенеративная медицина и клеточные технологии.— 2017.— Т. 19, № 1.— С. 63–73.
3. Васильев Р. Г. Мультипотентные стволовые клетки из бульбарного региона волосяного фолликула со свойствами производных нервного гребня / Р. Г. Васильев // Проблемы криобиологии.— 2012.— Т. 22, № 2.— С. 165–168.
4. Еричев В. П. Глаукома и нейродегенеративные заболевания/ В. П. Еричев, В. П. Туманов, Л. А. Панюшкина // Национальный журнал глаукома.— 2012.— № 1.— С. 62–68.
5. Кузьменко В. В. Возможности клинического применения стволовых клеток в офтальмологии / В. В. Кузьменко, Т. В. Ступникова, Ю. Б. Хейфец, Л. М. Вавилова // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке».— 2016.— Т. 18, № 1.— С. 34–43.
6. Риков С. О. Сучасний стан та динаміка поширеності глаукоми серед дорослого населення України / С. О. Риков, Н. В. Медведовська, Д. П. Троянов // Україна. Здоров'я нації.— 2012.— № 2 (22).— С. 119–121.
7. Elisseeff J. Future Perspectives for Regenerative Medicine in Ophthalmology / J. Elisseeff, M. Madrid, Q. Lu Qiaozhi // Middle East African J. Ophthalmology.— 2013.— Vol. 20.— P. 38–45.
8. Manuguerra-Gagne R. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment / R. Manuguerra-Gagne, P. R. Boulous, A. Ammar [et al.] // Stem Cells.— 2013.— Vol. 31.— P. 1136–1148.
9. Roubeix C. Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma/ C. Roubeix,

- D. Godefroy, A. Sapienza [et al.] // Stem Cell Research and Therapy.— 2015.— Vol. 6, № 1.— P. 177.
10. Vasyliov R. G. In vitro Properties of neural crest-derived multipotent stem cells from a bulge region of whisker follicle/R. G. Vasyliov, A. E. Rodnichenko, D. A. Zubov [et al.] // Biotechnologia Acta.— 2014.— Vol. 7, № 4.— P. 73–79.

Клеточная терапия глаукомной оптической нейропатии в эксперименте (краткосрочные результаты)

А. И. Яковец

**Национальная медицинская академия последиplomного
образования имени П. Л. Шупика, г. Киев**

Введение. Проблема разработки новых эффективных методов лечения глаукомной оптической нейропатии является одной из наиболее актуальных в современной офтальмологии.

Цель. Исследовать эффективность клеточной терапии с использованием постнатальных мультипотентных стволовых клеток производных нервного гребня (МСК-ПНГ) путем использования различных способов введения при экспериментальной глаукоме.

Материалы и методы. Проведено моделирование глаукомы на крысах Wistar путем внутрибрюшинного введения 0,18 % раствора адреналина гидротартрата в дозе, начиная с 10 мкг, доводя до 15 мкг на 100 г массы. Трансплантацию МСК-ПНГ осуществлено следующими способами: внутривенно вводили 5 млн клеток; ретро- и парабульбарно— по 0,5 млн клеток. Гистоморфометрический анализ сетчатки проводили на окрашенных гематоксилин-эозином срезах толщиной 5 мкм, через месяц после введения МСК-ПНГ.

Результаты. Трансплантация МСК-ПНГ вызвала положительные морфологические изменения различной степени при всех способах доставки. Так, внутривенное введение уменьшало отек всех слоев сетчатки, но мало способствовало восстановлению citoархитектоники слоев сетчатки. Парабульбарное введение МСК-ПНГ приводило к уменьшению отека и восстановлению citoархитектоники слоев, наиболее выраженное в слое ганглиозных клеток и во внутреннем слое сетчатки. При ретробульбарном введении МСК-ПНГ уменьшение отека и восстановление citoархитектоники слоев было наиболее выражено. По сравнению с моделью, статистически достоверно увеличивалось количество ядер во внутреннем и наружном ядерных слоях, хотя их количество оставалась ниже, чем у интактных животных.

Выводы. По результатам исследования положительный эффект трансплантации МСК-ПНГ при адреналиновой модели глаукомы был наиболее выражен при ретробульбарном введении клеток. Необходимы дальнейшие исследования механизмов воздействия трансплантированных МСК-ПНГ на восстановление структуры сетчатки.

Ключевые слова: глаукомная оптическая нейропатия, мультипотентные стволовые клетки, модель глаукомы.

Cell therapy of glaucomatous optic neuropathy in experiment (short-term results)

A. I. Yakovets

**Shupyk National Medical Academy
of Postgraduate Education, Kyiv**

Introduction. Development of new effective treatments for glaucomatous optic neuropathy is one of the most pressing issues of modern ophthalmology.

Purpose. To investigate the efficacy of cell therapy using cultured adult neural crest-derived multipotent stem cells (NC–MSCs) by various cell administration modes in experimental glaucoma.

Materials and methods. Modeling of glaucoma was performed on *Wistar* rats via intraperitoneal administration of 0.18% solution of adrenaline hydrotartrate in a dose range of 10–15 μg per 100 g. NC–MSCs administration modes: *i/v* 5×10^6 cells per animal; retro- and parabulbar injections of 0.5×10^6 cells per animal. Retina histomorphometric analysis was done on H&E stained sections, a month after the introduction of NC–MSCs.

Results. The transplantation of NC–MSCs induced positive morphological changes of varying degrees with all delivery methods. *I/v* administration reduced the swelling all the retina layers, but did not restore the retina structure. Parabulbar administration of NC–MSCs resulted in a reduction of swelling and restoration of layers' structure, most pronounced in the ganglionic and inner layer. Retrobulbar administration of NC–MSCs decreased swelling and layers' structure restoration was most pronounced. Compared with a model, the number of nuclei in the inner and outer nuclear layers was statistically increased, however, it was lower than in intact animals.

Conclusion. According to the results of the study, the positive effect of transplantation of MSC-PNG in the adrenaline model of glaucoma was most pronounced in retrobulbary administration of cells. Further studies of mechanisms involved in retina recovery should be done.

Key words: glaucomatous optic neuropathy, multipotent stem cells, model of glaucoma.

Відомості про авторів:

Яковець Антоніна Іванівна — аспірант кафедри офтальмології Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика. Адреса: м. Київ, вул. Дорогожицька, 9.