



УДК 617.71/.72-08:615.36:612-092.9

Л. В. Венгер, В. А. Ульянов

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ «ГЕМОКОРД» И «КРИОКОРД» НА СТРУКТУРУ ОБОЛОЧЕК ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА И ПРИДАТОЧНОГО АППАРАТА ГЛАЗА ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ

Одесский государственный медицинский университет

Успешное многолетнее использование тканевой терапии по методу академика В. П. Филатова при лечении глазной патологии [1] послужило основанием для развития клеточной терапии в офтальмологии. В лечении глазных заболеваний стали использовать эмбриональные и фетальные клетки и ткани. Эмбриофетальная клеточная терапия оказалась весьма эффективным и перспективным методом лечения [2].

За последнее время создан целый ряд препаратов, композиционной основой которых являются эмбриональные и фетальные ткани, разнородные по своему гистогенезу. Они имеют широкий спектр действия: могут осуществлять заместительную функцию, влиять на обменные процессы, стимулировать компенсаторные силы организма, в чем и реализуется их защитный и общестимулирующий эффект. Кроме того, им свойственна противовоспалительная активность [2]. Такое разнообразие свойств позволяет использовать клеточную трансплантацию при лечении многих заболеваний [3; 4], в том числе и в офтальмологической практике [5; 6].

Один из препаратов, применяющихся в клеточной терапии, — «Гемокорд». Он представляет собой суспензию криоконсервированных гемопоэтических, дендритных и других вспомогательных клеток кордовой пуповинной крови в аутологической плазме, содержит высокие концентрации биологически активных веществ (монокины, интерлейкины, интерферон, ферменты, гормоны, микроэлементы, аминокислоты и витамины), которые находятся в крови новорожденных в первые часы после рождения.

«Криокорд» — криоконсервированная сыворотка кордовой крови человека, содержащая биоактивные соединения в физиологических соотношениях. Выпускается в стерильных пластиковых ампулах, объем дозы 1,0 мл. Механизм действия препарата обусловлен уникальным составом и свойствами сыворотки кордовой крови, которая содержит комплекс репродуктивных иммуномодуляторов, весь спектр гормонов, свойственных организму новорожденного, ростовые и антипролиферативные вещества, гемопоэтины и адаптогены, микроэлементы, витамины. Пока-

зания: нарушения гормонального баланса, сахарный диабет, воспалительные процессы, нарушение процессов репарации, иммунологическая недостаточность и др.

Препараты «Гемокорд» и «Криокорд» сертифицированы и разрешены к медицинскому использованию в Украине (сертификат № 604/06-300200000 от 04.07.2006 г.).

Одна из главных проблем клеточной терапии — изучение действия донорского клеточного трансплантата на организм реципиента. До настоящего времени не установлены патогенетические связи между стадиями функционирования эмбриофетальных трансплантатов в организме хозяина с течением патологического процесса. В доступной литературе недостаточно четко определены критерии оценки эффективности данного метода лечения.

Вышеприведенные данные определяют необходимость дальнейшего изучения метода трансплантации эмбриофетальных клеток при лечении заболеваний глаз.

Цель работы: изучить влияние препаратов «Гемокорд»



и «Криокорд» на гистологическую структуру оболочек глазного яблока и придаточного аппарата глаза интактных животных.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проведены на 49 интактных половозрелых крысах линии Вистар в соответствии с научно-практическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных и работе с ними [7], а также в соответствии с положениями «Европейской конвенции по защите животных, которые используются для экспериментальных и научных целей». Животные содержались в условиях экспериментально-биологической клиники ОГМУ. Выбор крыс для исследований обусловлен сравнительно коротким жизненным и биологическим циклами, что дает возможность провести динамические наблюдения за более короткий период; а также легкостью ухода за животными и меньшими экономическими затратами на исследование.

Экспериментальные животные были разделены на две группы. В первой группе (28 животных) крысам однократно парабульбарно вводили 0,2 мл «Гемокорда». Животных выво-

дили из эксперимента на 7, 30, 90 и 180-е сутки после инъекции. Во второй группе (14 животных) крысам однократно субконъюнктивально вводили по 0,05 мл «Криокорда» на 3 и 9 часах у лимба. Животных выводили из эксперимента на 7-е и 30-е сутки после инъекции.

Гистологически исследовали бульбарную конъюнктиву, склеру, роговицу, сосудистую оболочку (радужка, цилиарное тело, собственно сосудистая оболочка), сетчатку, зрительный нерв, веко, парабульбарную клетчатку, глазодвигательные мышцы, слезную железу. После забора биоматериала проводили его фиксацию в 10%-м нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартным методикам. Готовили срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван Гизон [8].

В качестве контроля были использованы результаты проведенных нами гистологических исследований структуры оболочек глазного яблока и компонентов придаточного аппарата глаза у интактных половозрелых крыс линии Вистар (7 животных).

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что через семь дней после инъекции «Гемокор-

да» большинство структур глаза сохраняли строение, близкое к интактному, без каких-либо признаков деструкции. Вместе с тем, выявлен ряд характерных изменений, наиболее демонстративных в месте введения препарата, а также в рыхлой волокнистой соединительной ткани некоторых образований глазного яблока и вспомогательного аппарата.

Учитывая обширное пространство, занимаемое слезной железой, инъекция была выполнена между железой и стенкой орбиты. На периферии слезной железы, в месте, противоположном глазному яблоку, обнаружены небольшие очаги изменения функциональной активности железистой ткани, четко отграниченные от окружающей паренхимы (рис. 1).

В этих зонах ацинусы не определялись, клетки железы утрачивали полярность, ядра занимали центральное положение, цитоплазма сохраняла некоторую ячеистость. Некоторые ядра по форме и насыщенности хроматином были близки к интактным, некоторые — деформированы. В отдельных зонах клетки подвергались гидropическим изменениям различной степени выраженности. В ядрах железистых клеток увеличивалось количество гетерохроматина (рис. 2).

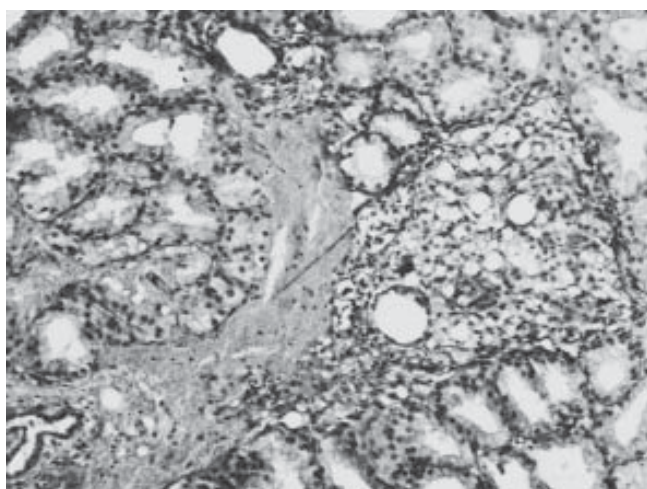


Рис. 1. Слезная железа, парабульбарная клетчатка, 7-е сутки после введения «Гемокорда». Окраска гематоксилин-эозином. × 100

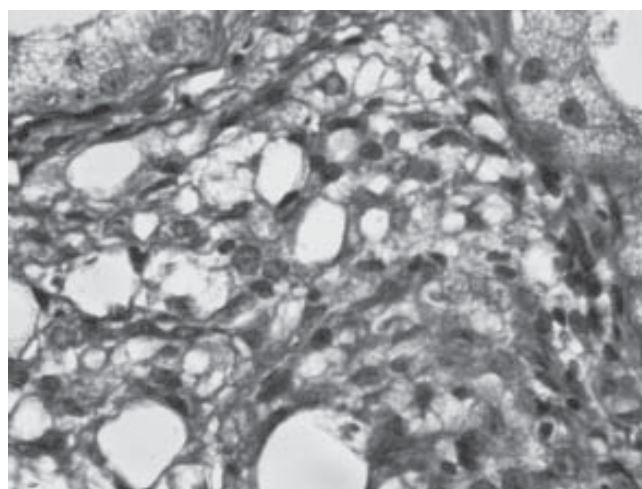


Рис. 2. Слезная железа, парабульбарная клетчатка, 7-е сутки после введения «Гемокорда». Окраска гематоксилин-эозином. × 400



Участки паренхимы слезной железы с признаками атрофических изменений прилежали к парабульбарной клетчатке с гемоцитарной инфильтрацией. В инфильтрате преобладали бластные формы, особенно миелоцитарного роста, в частности, было много промиелоцитов и миелоцитов. Вместе с тем, наблюдалось много зрелых гранулоцитов. Некоторые из клеток напоминали дегранулировавшие базофилы. Представленная гистологическая картина свидетельствует о том, что в препарате находятся трансплантированные клетки.

Сосуды в прослойках соединительной ткани были более насыщены лейкоцитами, чем в норме. Местами в строме наблюдалась умеренная мононуклеарная инфильтрация, топографически не связанная с сосудами.

Изменения в других отделах глаза сводились также к более выраженной гемоцитарной инфильтрации прослоек рыхлой соединительной ткани, в частности, в бульбарной конъюнктиве и, особенно, в конъюнктиве сводов (рис. 3).

Помимо типичных фибробластов и гистиоцитов, здесь наблюдалось много лимфоцитов и гранулоцитов, включая палочкоядерные и юные формы (метамиелоциты). Наблюдались и бластные клетки, весь-

ма похожие на обнаруженные в клетчатке возле слезной железы, но здесь они были единичными (рис. 4).

Изменений в сетчатой оболочке не выявлено.

Следует отметить, что ни в оболочках глазного яблока, ни в структурах придаточного аппарата парного глаза не выявлено отклонений гистологической картины по сравнению с интактными животными.

Через месяц после введения «Гемокорда» в парабульбарных тканях никаких деструктивных изменений не выявлено. Большинство структур глаза и вспомогательного аппарата не отличались от интактных. Изменения в слезной железе выражены в меньшей степени. Слезная железа на большем протяжении имела интактный функционально активный вид.

Кровоснабжение хорошо развито, сосуды умеренно полнокровны. Вместе с тем, выявлено несколько (2–3) ограниченных, довольно крупных инфильтрата, которые, по нашему мнению, являлись клетками трансплантата (рис. 5).

Интенсивная полиморфно-ядерная инфильтрация с преобладанием зрелых нейтрофилов обнаружена в бульбарной конъюнктиве того же глаза, где определялась инфильтрация в ткани, прилежащей к

слезной железе. Причем она захватывала не только собственную пластинку, но и все слои эпителия, вплоть до поверхностных (рис. 6).

Следует отметить, что практически все прослойки рыхлой соединительной ткани различных изучаемых объектов (лимб, склера, парабульбарная клетчатка и пр.) не отличались от интактных.

Радужка имела четко выраженную архитектуру, все слои хорошо визуализировались (рис. 7).

Рыхлая соединительная ткань сосудистого слоя с хорошо выраженными, умеренно полнокровными сосудами. Цилиарное тело без изменений. Соединительнотканная основа отличалась хорошо развитым микроциркуляторным руслом, обычным набором клеток; эпителий без изменений. В собственной сосудистой оболочке особых изменений не обнаружено (рис. 8).

В сетчатке и роговице (рис. 9) изменений на 30-е сутки после введения «Гемокорда» обнаружено не было.

Строение оболочек глазного яблока и вспомогательного аппарата парного глаза не отличалось от такового у интактных животных.

Через три месяца после введения «Гемокорда» отсутствовали изменения со стороны

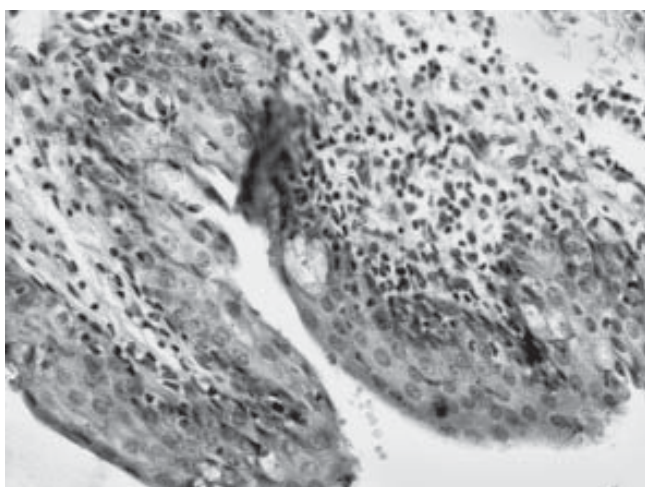


Рис. 3. Бульбарная конъюнктура, 7-е сутки после введения «Гемокорда». Окраска гематоксилин-эозином. × 400

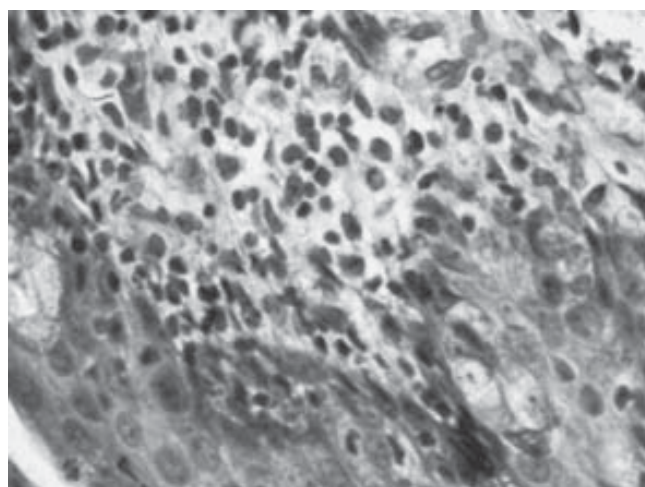


Рис. 4. Трансплантат в рыхлой волокнистой соединительной ткани, 7-е сутки после введения «Гемокорда». Окраска гематоксилин-эозином. × 400

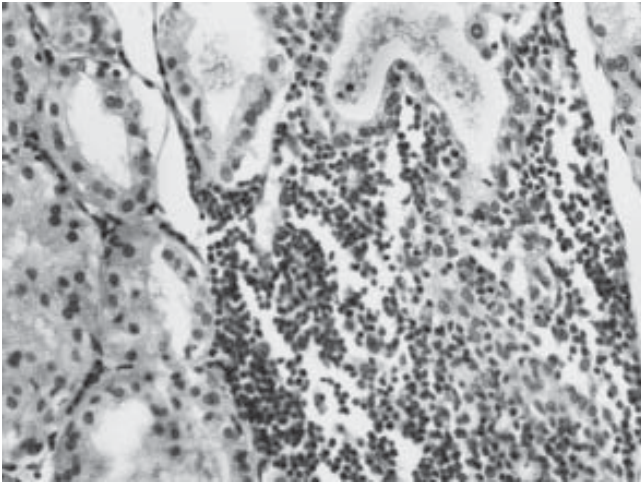


Рис. 5. Слезная железа, парабульбарная клетчатка, трансплантат, 30-е сутки после введения «Гемокорда». Окраска гематоксилин-эозином. × 200

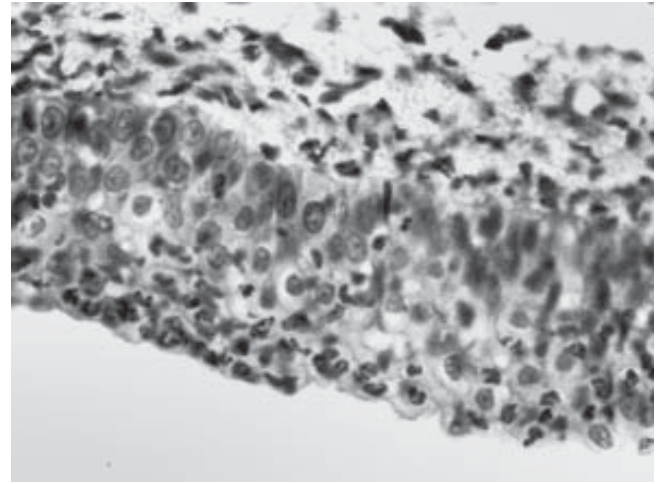


Рис. 6. Конъюнктура над местом введения «Гемокорда» на 30-е сутки после инъекции. Окраска гематоксилин-эозином. × 200

оболочек глазного яблока и структур придаточного аппарата в месте инъекции. В парабульбарной клетчатке определялся инфильтрат, по нашему мнению, являющийся трансплантатом.

Наконец, через шесть месяцев мы не обнаружили каких бы то ни было изменений в структурах глазного яблока и придаточного аппарата, отсутствовали и инфильтраты.

Наблюдение за животными после субконъюнктивального введения «Криокорда» в течение 30 дней не выявило изменений со стороны структур глазного яблока и придаточного аппарата глаза.

Заключение

Таким образом, выявленные изменения после введе-

ния «Гемокорда» отображают основные этапы жизни трансплантата в организме реципиента. Изменения на седьмые сутки подтверждают реакцию тканей реципиента на трансплантат. Следует отметить локальность данной реакции, о чем свидетельствуют реактивные изменения в прилежащих к трансплантату структурах, отсутствие реакции со стороны структур парного глаза.

Через месяц после инъекции наблюдается взаимная адаптация клеток трансплантата и тканей реципиента. Свидетельством тому являлось увеличение функциональной активности клеток слезной железы, прилежащей к трансплантату, возрастание количества клеток в трансплантате. Наконец, через три месяца наступа-

ла полная адаптация, что подтверждалось отсутствием реактивных изменений тканей глаза и структур придаточного аппарата. По нашему мнению, в этом периоде эффект от введения трансплантата может быть максимальным. Наконец, через шесть месяцев в парабульбарной клетчатке отсутствовали следы трансплантата.

После субконъюнктивального введения «Криокорда» гистологических изменений со стороны структур глазного яблока и придаточного аппарата глаза не выявлено.

Полученные данные свидетельствуют о хорошей переносимости препарата, отсутствии его негативного влияния на структуры глаза в физиологических условиях.

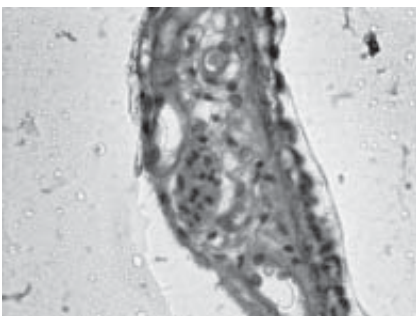


Рис. 7. Радужка, 30-е сутки после инъекции «Гемокорда». Окраска гематоксилин-эозином. × 400

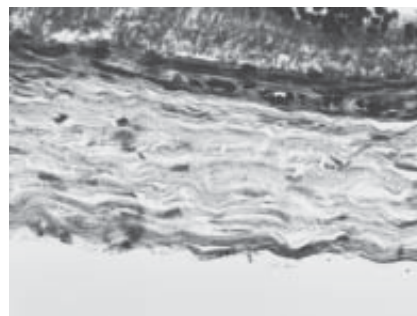


Рис. 8. Склера, сосудистая оболочка, 30-е сутки после инъекции «Гемокорда». Окраска гематоксилин-эозином. × 400

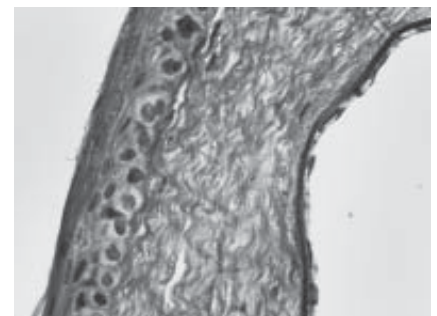


Рис. 9. Роговица, 30-е сутки после инъекции «Гемокорда». Окраска гематоксилин-эозином. × 400



ЛИТЕРАТУРА

1. *Логай И. М.* Тканевая терапия по методу академика В. П. Филатова, основные направления и перспективы ее развития / И. М. Логай, В. П. Соловьева, Е. П. Сотникова // *Офтальмологический журнал*. — 1995. — № 2. — С. 68-73.

2. *Демин Ю. А.* Клеточная терапия в офтальмологии / Ю. А. Демин // *Международный медицинский журнал*. — 2000. — № 3. — С. 53-55.

3. *Грищенко В. И.* Концепция клеточной терапии / В. И. Грищенко, Б. П.

Сандомирский // *Проблемы криобиологии*. — 2000. — № 1. — С. 3-6.

4. *Сухих Г. Т.* Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее / Г. Т. Сухих // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 1998. — Т. 126. — Прил. 1. — С. 3-13.

5. *Цимбалюк В. И.* Нейротрансплантация / В. И. Цимбалюк // *Лечение и диагностика*. — 2000. — № 3. — С. 15-19.

6. *Заготовка*, криоконсервування та клінічне застосування ембріофе-

тальних та фетальних клітин людини в офтальмологічній практиці : метод. рекомендації / укл. : В. І. Грищенко [та ін.]. — Х., 2000. — 15 с.

7. *Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними* / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. — К. : Авіценна, 2002. — 156 с.

8. *Мікроскопічна техніка* / под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. — М. : Медицина, 1996. — 544 с.

УДК 547.854.4+547.431.4+547.96

Ю. І. Губський¹, О. В. Вельчинська¹, Н. І. Шарикіна², Е. О. Коваленко³

ХІМІЯ 5-МЕТИЛУРАЦИЛУ ТА ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ ЙОГО НОВИХ ПОХІДНИХ

¹Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ,

²Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ,

³Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Сьогодні цілком закономірними є пошуки шляхів елімінації пухлинних клітин із множинною лікарською стійкістю за допомогою різних механізмів. Розвивається сучасна концепція імунотерапії пухлин. Сучасні імунотерапевтичні агенти впливають як на пухлину, так і на різні регуляторні системи організму (в тому числі й на імунну систему) і призводять до протипухлинного ефекту.

Важливою є розробка сучасних лікарських засобів, що сприяють захисту організму людини від шкідливого впливу факторів навколишнього середовища. Одним із перспективних шляхів пошуку засобів лікування пухлинної хвороби є створення нових антиметаболітів пуринового та піримідинового обміну, здатних впливати на структуру та функції нуклеїнових кислот. Наявність цих речовин в організмі людини й обумовила актуальність дослідження їхньої ролі у фізіології мак-

роорганізму. Вивчається також використання малих активних молекул для фармакопейних форм медичних біологічних препаратів з метою інгібіції пухлинного росту [1].

Останнім часом значно зростає кількість досліджень щодо синтезу нових похідних 5-заміщених урацилів, вивчення їхньої біологічної активності [2–5].

Експериментально встановлено, що ряд сполук — похідних піримідину (метилурацил, пентоксил та ін.) проявляють анаболічну й антикатаболічну активність. Ці препарати прискорюють процеси клітинної регенерації, сприяють загоєнню ран, стимулюють клітинні та гуморальні фактори імунітету. Так, відомий лікарський засіб «Метилурацил» проявляє протизапальну дію, є стимулятором лейкопоезу [6].

Модифікація гетероциклічної молекули за допомогою введення галоген(фтор)вмісних фармакофорів приводить до

підвищення їх розчинності в ліпідах і робить лікарські засоби ефективнішими у зв'язку із легкістю їх транспорту в організмі, а також наближає їх за хімічною будовою до відомого протипухлинного препарату 5-фторурацилу [7]. Метод введення фармакофорних груп у молекули досліджувався нами на молекулах поліфторвмісних ацетиленових спиртів, заміщених піримідинів [8]. Описаний нами метод дозволяє отримувати селективно поліфункціональні молекули з потенційними біологічними властивостями.

Мета даної роботи полягає в хімічній модифікації молекули 5-метилурацилу з подальшим вивченням біологічної активності нових синтезованих похідних 5-метилурацилу, а саме: після конструювання потенційно активних структур розроблено нові препаративні методи синтезу оригінальних гетероциклів на основі 5-метилурацилу, а також фторвмісних син-

