

Экспериментальная модель лимбальной недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия для исследования действия криоконсервированных клеток крови

Е.Н. СВИДКО, Ю.А. ДЕМИН

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Experimental Model of Limbal Inefficiency of Cornea Epithelia Regional Stem Cells for Investigation of Cryopreserved Blood Cell Influence

YE.N. SVIDKO, YU.A. DEMIN

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Наиболее оправданной моделью лимбальной недостаточности региональных стволовых клеток является модель с использованием аппликации 0,04% MMC на область лимба. Однако известно, что MMC обладает цитостатическим действием на клетки роговицы и криоконсервированные клетки крови. Поэтому для исследования необходимо знать время выведения препарата из роговицы животного, адаптировать данную модель для получения наиболее достоверных результатов и предотвращения его цитостатического действия на вводимые препараты.

Для разработки модели были взяты 3 кролика (6 глаз). По результатам измерения роговицы штангенциркулем были отобраны кролики с одинаковым диаметром роговицы, который составил 10 мм. Каждому животному была выполнена пахиметрия на ультразвуковом пахиметре Ocuscan фирмы Alcon. Затем смоделирована дистрофия роговицы. Для приготовления исходного испытываемого раствора использовали флакон препарата, содержащий 2 мг митомидина С. Содержимое флакона растворяли в 5 мл воды очищенной (концентрация митомидина С – 0,04%). Экспонирование на роговице глаза кружка фильтровальной бумаги проводили с различными интервалами времени: 0,5; 1, 2, 3, 4 или 5 мин. После экспонирования кружок помещали в вialку объемом 20 мл и герметично закрывали резиновой пробкой. В каждую вialку одной пипеткой 1 класса добавляли 2 мл метилового спирта. Затем вialки помещали на 5 мин на УЗ баню. Количественное определение митомидина С в образцах проводили, используя жидкостную хроматографию с диодноматричной детекцией. В качестве разделяющей колонки использовали колонку с октадецилсилильной привитой фазой, имеющей 3-кратное эндкипирование. В качестве аналитической длины волны использовали максимум поглощения митомидина С при 360 нм, что обеспечило достаточно высокую селективность сигнала в сочетании с низким порогом обнаружения вещества в пробах. Элюирование пробы проводили, используя градиентный режим для двух фаз – ацетонитрила и фосфатного буферного раствора (рН 3,0) с концентрацией ион-парной добавки – гептансульфоната натрия – 0,01 М. Скорость диффузии (v) составила 19,98 мкг в минуту. Таким образом, время выведения митомидина С составит 26,2 ч.

Можно сделать вывод, что применение криоконсервированных клеток пуповинной крови оправдано при окончании данного периода времени.

The most reasonable model of limbal insufficiency of regional stem cells is the model with the use of 0.04% MMC application to the limb area. However it is known that MMC cytostatically affects the cornea cells and cryopreserved blood cells. So for investigation it is necessary to know the time of removal of the preparation from animal cornea, to adapt this model for the obtaining of the most significant results and for prevention of its cytostatically influence on the injected preparations.

To develop the model 3 rabbits (6 eyes) were used. According to the results of the cornea measurements with the caliper there were selected the rabbits with the same 10 mm diameter of cornea. Also each one underwent the pachymetry with ultrasonic pachymeter Ocuscan (Alcon). Later the cornea dystrophy was simulated. For the preparation of an initial experimented solution the flask of preparation containing 2 mg of mitomycin C was used. The content of flask was dissolved in 5 ml of purified water (mitomycin C concentration was 0.04%). The exposure of filtrated paper circle was carried-out on the cornea within different time intervals, 30 sec, 1, 2, 3, 4 and 5 min. After the exposure the circle was placed into the 20 ml vial and closed hermetically with a rubber plug. 2 ml of methyl alcohol was added with the same pipette of the first class into each vial. Later the vials were placed into the ultrasonic bath for 5 min. The quantitative determination of mitomycin C in the samples was carried-out by means of the liquid chromatography with the single diode-matrix detection. Octadecylsilic bonded phase having the 3-fold endotyping was used as the dividing column. The maximal absorption of mitomycin C at 360 nm was used as the analytical wave length that provided quite a high signal selectivity with the low detection limit of the substance in the samples. The sample elution was performed with the gradient regimen for two phases, acetonitrile and phosphate buffer solution having pH 3.0 with the concentration of ion-pair addition of 0.01 M sodium heptanesulfonate. The diffusion speed (v) was 19.98 μ g per min. Thus the removal time of mitomycin C was 26.2 hrs.

It may be concluded that the application of umbilical blood cryopreserved cells is expedient at the end of the given time period.