

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-1-63-73

КЛЕТОЧНАЯ НЕЙРОПРОТЕКЦИЯ КАК СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ОПТИЧЕСКИХ НЕЙРОПАТИЙ

С.А. Борзенок^{1, 2}, М.Х. Хубецова¹, И.Н. Сабурин^{3, 4}, Н.А. Гаврилова², Х.Д. Тонаева¹, Д.С. Островский¹, Н.И. Ланевская^{1, 2}, Н.В. Кошелева³, И.М. Зурина³

¹ ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова», Москва, Российская Федерация

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель. Разработать технологию создания 3D-сфероидов мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток лимба кадаверных глаз человека, способных к длительной и достаточной секреции фактора роста нервов и нейротрофического фактора головного мозга. **Материал и методы.** Из кадаверных глаз человека ($n = 8$) выделялась зона лимба, содержащая наибольшее количество ММСК. Культивирование проводилось в среде: DMEM/F12 (1:1), L-глутамин, пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В, NERES, инсулин, дексаметазон, 10 об. % FBS при стандартных условиях (5% CO₂, 37 °C), смена среды проводилась каждые 3 дня. Фенотип полученной культуры клеток изучали методом иммунофенотипирования с использованием набора маркеров к мембранным белкам (CD73, CD105, CD19, CD90, CD133). Стимуляцию секреции нейротрофических факторов проводили по двухэтапной методике с использованием неспецифических факторов активации. 3D-клеточные сфероиды создавали с использованием агарозных планшетов (3D Petri Dishes, Microtissue, США) для трех групп сравнения: I группа – контрольная, сфероиды из интактной 2D-культуры ММСК; II группа – сфероиды из индуцированной 2D-культуры ММСК; III группа – сфероиды из интактной 2D-культуры ММСК, индуцированные на 1-е сутки культивирования. Образцы консервационной среды замораживались при $t = -80$ °C для дальнейшего исследования на содержание в них ФРН и БДНФ методом иммуноферментного анализа. **Результаты.** Индукция 3D-сфероидов ММСК лимба способствует значительному увеличению продукции ФРН и НФГМ, однако в дальнейшем наблюдается выраженное снижение секреции этих факторов. Проведение индукции приводит к изменению морфологии сфероидов: потере компактности, появлению «бахромчатости» (дебриса). Подобные изменения свидетельствуют о нежизнеспособности полученных конструкций. Сфероиды, созданные из индуцированных ММСК, способны к стабильной секреции НТФ, однако уровень секреции факторов значительно меньше по сравнению с группой контроля. **Заключение.** 3D-клеточные сфероиды, созданные из 2D-культуры интактных ММСК лимба, могут рассматриваться в качестве клеточного препарата для безопасной и длительной нейропротекции в лечении оптических нейропатий.

Ключевые слова: оптическая нейропатия, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки лимба, 3D-культуры, клеточные сфероиды, фактор роста нервов (ФРН), нейротрофический фактор головного мозга (НФГМ), клеточная терапия, нейропротекция.

Для корреспонденции: Хубецова Магина Хетаговна. Адрес: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, дом 59а. Тел. (499) 488-85-58. E-mail: porporina@inbox.ru.

For correspondence: Khubetsova Madina Khetagovna. Address: 59a, Beskudnikovsky bld., Moscow, 127486, Russian Federation. Tel. (499) 488-85-58. E-mail: porporina@inbox.ru

CELLULAR NEUROPROTECTION AS A MODERN TREATMENT APPROACH FOR OPTIC NEUROPATHY

S.A. Borzenok^{1, 2}, M.Kh. Khubetsova¹, I.N. Saburina^{3, 4}, N.A. Gavrilova², Kh.D. Tonaeva¹, D.S. Ostrovskiy¹, N.I. Lanevskaya^{1, 2}, N.V. Kosheleva³, I.M. Zurina³

¹ The S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

³ The Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

⁴ Russian Medical Academy of Postgraduate Education Studies, Moscow, Russian Federation

Aim. To develop technology to create 3D-spheroid multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) of limbal cadaveric human eyes, capable of safe and long-term secretion of nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Materials and methods.** MMSC were obtained by cultivation of limbal fragments, released from cadaveric donor human eye. Cultivation was carried out in DMEM/F12 medium, supplemented with L-glutamine, penicillin, streptomycin, amphotericin B, HEPES, insulin, dexamethasone and 10 vol.% FBS under standard conditions (5% CO₂, 37 °C), medium change was performed every 3 days. To determine the phenotype of the received cell culture the method of immunophenotyping by marker proteins to MMSC (CD73, CD105, CD19, CD90, CD133) was used. Stimulation of neurotrophic factor secretion was performed via a two-step procedure. 3D-cell spheroids were created with the help of agarous plates for three groups of comparison, where group I was control group, spheroids of intact 2D-culture MMSK; group II – spheroids of previously induced 2D-culture MMSC; group III – spheroids of 2D-MMSC induced on the 1st day of cultivation. Cell cultures supernatants were selected in different periods for NGF and BDNF follow-up study by ELISA procedure. **Results.** Induction of 3D-spheroids of limbal MMSC promotes short-term increase of the level of BDNF and NGF, but further, the secretion of these factors significantly decreases. Induction leads to a change in the morphology of spheroids: loss of compactness and emergence of «fringed» (debris). Such changes indicate of frailty of received constructions. Spheroids from previously induced MMSC are capable of stable NTF secretion, but the level of secretion is much less as compared to the control group. **Conclusion.** 3D-cell culture of intact 2D-culture of limbal MMSC can be considered as cellular medication for a safe and long-term neuroprotection in optic neuropathy treatment.

Key words: optic neuropathy, limbal multipotent mesenchymal stem cells, 3D-culture, cellular spheroids, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), cell therapy, neuroprotection.

АКТУАЛЬНОСТЬ

По данным А.Ф. Бровкиной (2008), в основе развития оптической нейропатии любого типа лежит комплекс идентичных факторов, степень интенсивности которых различна в зависимости от основного патологического процесса [1].

Глаукомная оптическая нейропатия (ГОН) является основной причиной необратимой слепоты в мире. Глаукомой страдают более 60 миллионов человек, из них около 4 миллионов – абсолютно слепые [2].

Долгое время глаукому рассматривали как изолированное заболевание глаз, основным фактором риска которого считали повышенное внутриглазное давление (ВГД). Это обстоятельство обусловило тот факт, что к основным способам лечения глаукомы относятся методики, направленные на стабилизацию ВГД, включающие применение медикаментозных, лазерных или хирургических методов лечения. Однако в ряде крупных многоцентровых исследований было показано, что несмотря на эффективное снижение ВГД, со временем наблюдается прогрес-

сирование глаукомного процесса, что свидетельствует о наличии механизмов развития глаукомной оптической нейропатии (ГОН), не связанных с уровнем ВГД [3, 4]. Кроме того, исследования последних лет показали, что при глаукоме наблюдаются изменения не только в глазном яблоке, но и на протяжении всего зрительного пути. Так, при морфологических исследованиях головного мозга животных с экспериментальной глаукомой выявили значительную атрофию латеральных колленчатых тел (ЛКТ), причем выраженность атрофии зависела от длительности офтальмогипертензии и соответствовала изменениям в диске зрительного нерва [5, 6].

При помощи МРТ-диагностики F.G. Garaci в 2009 г. показал достоверное уменьшение диаметра зрительного нерва и снижение плотности сигнала с области зрительной лучистости у пациентов с ПОУГ на различных стадиях заболевания [7].

Эти данные подтверждают современную патогенетическую концепцию, согласно которой ПОУГ – нейродегенеративное заболевание [8]. Следует отметить, что данная концепция не исключает другие

теории, а лишь дополняет их. Возможно, именно нейродегенеративная теория сможет объединить все накопленные данные о патогенезе ГОН.

При нейродегенеративных заболеваниях начальное повреждение включает механизм вторичной трансинаптической дегенерации, приводящий к тому, что каскадная гибель клеток продолжается даже после удаления первичного патологического стимула [9–11]. Возможно, именно этим механизмом объясняется прогрессирующее снижение зрительных функций у пациентов с глаукомой на фоне достижения толерантного уровня ВГД.

В основе процесса вторичной дегенерации лежит апоптоз, представляющий собой многоступенчатый, до определенной стадии обратимый процесс, связанный с экспрессией целого ряда генов и вовлечением многих ферментных систем. В развитии апоптоза выделяют контрольные точки, в которых возможен выбор между реализацией запрограммированной гибели и выживанием клетки [12]. Это обстоятельство определяет повышенный интерес исследователей к изучению различных модуляторов апоптоза. На сегодня можно выделить следующие модуляторы апоптоза: ингибиторы каспаз [13], пептиды, блокирующие межклеточные контакты [14], ингибиторы кальпаинов [15], ингибиторов белкового синтеза крыс [16], нейротрофические факторы (НТФ) [17]. Последние представляют наибольший интерес в стабилизации прогрессирования ГОН.

Нейротрофины представляют собой семейство крупных полипептидов, регулирующих выживание, развитие и функцию нейронов [18].

Было установлено, что в норме ГКС млекопитающих экспрессируют следующие рецепторы нейротрофинов: Trk-A, Trk-B, Trk-C p75NTR [19, 20]. Обнаруживается некая преферентность связывания определенного нейротрофина с рецепторами. Например, фактор роста нервов (ФРН) предпочтительно взаимодействует с Trk-A, а нейротрофический фактор головного мозга (НФГМ) – с Trk-B, тогда как нейротрофин-3 (НТ-3) – с Trk-C или с Trk-A рецепторами [21]. В эксперименте *in vivo* было доказано, что при повышении ВГД происходит изменение экспрессии тирозинкиназных рецепторов и НТФ. Так, наблюдается устойчивое увеличение экспрессии Trk-A и Trk-C, однако рецептор Trk-C также экспрессируется клетками микроглии, активация которых является одним из ключевых звеньев глаукомной оптической нейропатии.

Также было доказано, что повышение ВГД приводит к компенсаторному повышению уровня ретинального НФГМ [22]. Эти данные обосновывают широкий интерес исследователей к применению НФГМ и ФРН в лечении ГОН. В экспериментах *in vivo* была доказана выраженная нейропротекция ганглиозных клеток сетчатки данными нейротрофическими факторами [23–27].

Однако в настоящее время вопрос о безопасной и длительной доставке НТФ все еще остается трудно преодолимым препятствием. Непосредственная доставка нейротрофических факторов в область повреждения требует повторных внутриглазных вмешательств – вследствие кратковременности эффекта, обусловленного быстрым расщеплением факторов внеклеточными протеазами. Необходимость повторных инъекций значительно повышает риск осложнений, приводящих к нецелесообразности терапии из-за инверсии соотношения риск/польза.

Применение ФРН и НФГМ в форме глазных капель увеличивает уровень нейротрофинов во всех тканях глаза, в том числе и в сетчатке, что было подтверждено методами радиоавтографии и иммуноферментного анализа [28]. Однако капельная система доставки характеризуется противоречивыми результатами, обусловленными необходимостью длительных, многократных инстилляций, и зависит от комплаентности пациента.

В настоящее время в регенеративной медицине широко изучается применение мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) в лечении нейродегенеративных заболеваний. Было установлено, что ММСК имеют высокий уровень секреторной активности и способны продуцировать НТФ [29]. В единичных экспериментальных работах показана выраженная нейропротекция ГКС после трансплантации ММСК в полость стекловидного тела глаза крысы с индуцированной офтальмогипертензией [23, 30].

Однако для полноценного функционирования клеток, поддержания высокой степени стабильности генома и нормального уровня жизнедеятельности необходимо сохранение межклеточных взаимодействий. Наиболее эффективной и максимально приближенной по свойствам и организации к естественной тканевой системе может быть система 3D-культуры, представленная сферическими конгломератами.

Так, в настоящее время изучаются вопросы конструирования искусственной роговицы на базе 3D-клеточной культуры ММСК лимба [31]. Известно, что ММСК лимба имеют фенотип, сходный с ММСК костного мозга, и могут использоваться в клинике при лечении заболеваний глаз [32, 33].

В изученной нами литературе мы не нашли данных о применении 3D-клеточных сфероидов ММСК лимба в лечении ГОН. Это и послужило целью нашего исследования

Цель: разработать технологию создания 3D-сфероидов мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток лимба кадаверных глаз человека, способных к длительной и достаточной секреции фактора роста нервов и нейротрофического фактора головного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве первичного источника ММСК использовали лимбальные фрагменты глазных яблок ($n = 8$) доноров-трупов ($n = 4$) в возрасте от 29 до 63 лет, предоставленные Глазным тканевым банком ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова». Время от момента констатации биологической смерти до выделения тканевых фрагментов – от 9 до 18 часов. Тканевые фрагменты лимба были выделены по предложенной ранее технологии [34].

Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из трупных донорских глаз человека, проводились в соответствии с утвержденными процедурами, законодательными и нормативно-правовыми документами с учетом Лицензии на виды медицинской деятельности Росздравнадзора № ФС-99-01-008251 от 18.02.2013, выданной ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Изолированные фрагменты лимба переносили в культуральные флаконы 25 мм² (Corning), культивирование осуществлялось в среде: DMEM/F12 (1:1), L-глутамин – 0,58 г/л, NEPES – 10 мМ (ПанЭко, Россия), пенициллин – 10 000 ЕД/мл, стрептомицин – 10 000 ЕД/мл, амфотерицин В – 1,25 мг/мл, инсулин – 0,4 мкМ, дексаметазон – 10 нМ, фетальная бычья сыворотка – 10 об. % (HyClone, США), при стандартных условиях (5% CO₂, 37 °С), смена среды проводилась каждые 3 дня.

При достижении монослоем клеток 80–90% конfluence осуществляют пассирование культуры с использованием растворов Версена и 0,25% трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Россия). Действие трипсина инактивировали добавлением 10 об. % фетальной бычьей сыворотки. Подсчет клеток проводили с использованием камеры Горяева, плотность клеток при расеве составляла 500 тыс. кл./мл. В экспериментальных сериях использовали культуры ММСК четвертого пассажа.

Для определения иммунофенотипа полученной культуры клеток проводили иммунофенотипирование со следующими маркерными белками: CD90 FITC, CD105 PE, CD73 PE (Biolegend, США), CD133 PE (Miltenyi Biotec GmbH, США), CD19 PE (BD Biosciences, США).

Клетки отмывались от полной ростовой среды раствором Версена, обрабатывались 0,25%-ным раствором трипсина-ЭДТА. Подсчитывалось количество клеток и проводилось их центрифугирование (300 г, 5 мин). Полученный осадок ресуспендировался в растворе фосфатно-солевого буфера (рН = 7,4) с 1 об. % фетальной бычьей сыворотки и аликвотировался. Каждая пробирка инкубировалась

в темноте (при 25 °С, 15 мин) с антителами (10 мкл р-ра антител на 1 млн клеток). Полученные результаты анализировались на проточном цитофлуориметре «CytoFLEX» (Beckman Coulter Inc, США).

Нами была проведена индукция секреции НТФ ММСК лимба по двухэтапной методике с использованием неспецифических факторов активации [35]. Первый этап: EGF, hbFGF (ПанЭко, Россия), добавка N2 (Life Technologies, США); второй этап через 72 часа: дибутирил цАМФ, NRG1-beta 1, PDGF (R&D Systems, США), 3-изобутил-1-метилксантин (Santa Cruz Biotechnology, США).

Из охарактеризованной 2D-культуры ММСК лимба создавались 3D-сфероиды с использованием неадгезивных 256-луночных агарозных планшетов (3D Petri Dishes, Microtissue, США): I группа – контрольная, сфероиды из интактной 2D-культуры ММСК; II группа – сфероиды из индуцированной 2D-культуры ММСК лимба; III группа – сфероиды из интактной 2D-культуры ММСК, индуцированные на 1-е сутки 3D-культивирования. Посевная концентрация ММСК составляла 256 000 кл./мл.

Ежедневное прижизненное наблюдение за полученными 2D- и 3D-культурами ММСК лимба осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX 41 (Olympus, Япония) методами фазово-контрастной и световой микроскопии.

Изучение содержания нейротрофических факторов ФРН и НФГМ проводилось методом ИФА. Супернатанты клеточных культур отбирались в разные сроки культивирования и хранились при t – 80 °С. ИФА проводился на микропланшетном фотометре «Anthos» (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия) в соответствии с инструкцией производителя (Almabion).

Статистическая обработка выполнялась на персональном компьютере с использованием стандартных статистических программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ММСК лимба в условиях 2D-культивирования формировали монослой и имели характерную веретеновидную форму (рис. 1).

Из рекомендованных Международным обществом по клеточной терапии дифференцировочных маркеров, характеризующих культуры ММСК, изучили уровень экспрессии: CD105 (эндоглин) – рецептор TGF-βIII, имеющийся у эндотелиальных клеток, синцитиотрофобластов, макрофагов и фибробластов соединительной ткани, у ММСК эндоглин играет преимущественно сигнальную роль в процессах хондрогенной дифференцировки и участвует во взаимодействии ММСК и гемопоэтических клеток в костном мозге; CD90 (Thy-1, дифференцировочный антиген Т-лимфоцитов) ши-

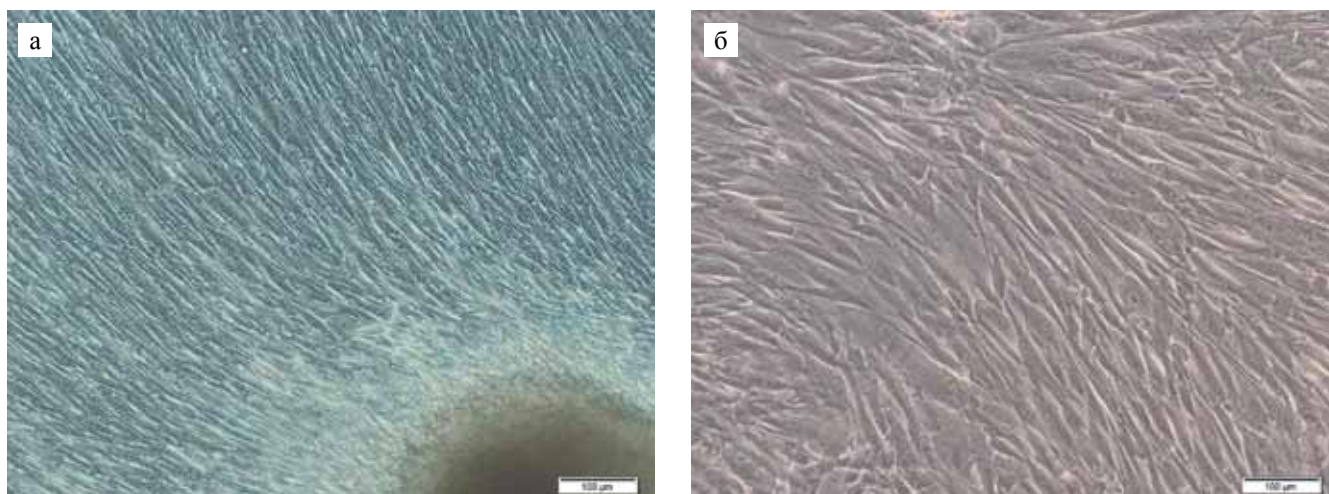


Рис. 1. 2D-культура ММСК аллогенных фрагментов лимба: а – 0-й пассаж; б – 4-й пассаж. Световая микроскопия. $\times 100$

Fig. 1. Phase-contrast images of 2D culture of limbal MMSC at passage 1 (a) and passage 4 (б), scale bars, 100 μm

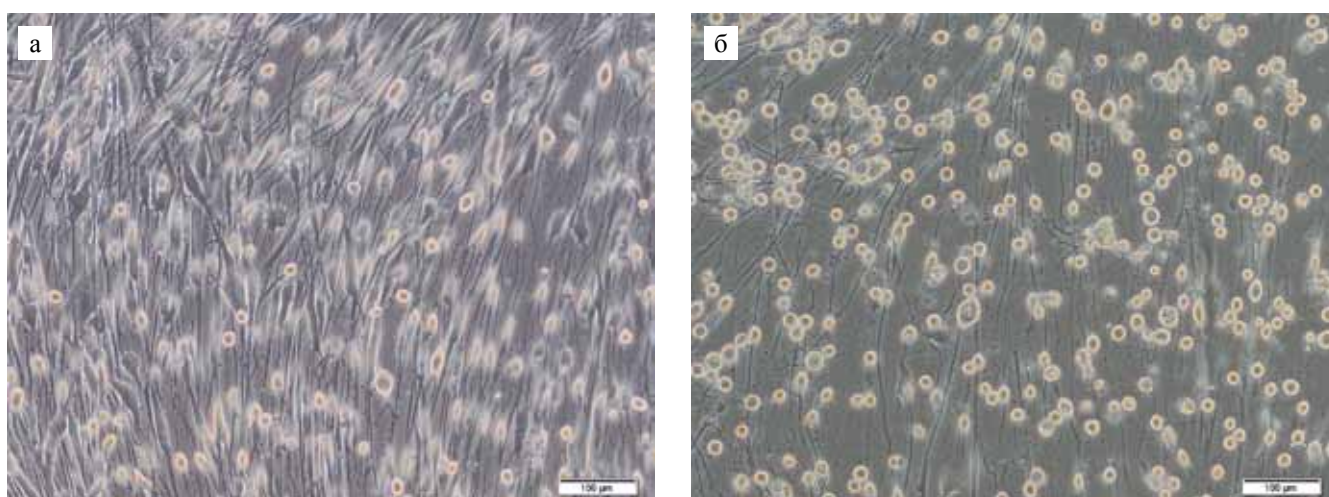


Рис. 2. 2D-культура ММСК аллогенных фрагментов лимба: а – I этап индукции; б – II этап индукции. Световая микроскопия. $\times 100$

Fig. 2. Phase contrast images of 2D culture of limbal MMSC at I phase induction (a), II phase induction (б), scale bars, 100 μm

Таблица 1

Иммунофенотипический анализ экспрессии поверхностных маркеров ММСК лимба в 2D-культуре, 4-й пассаж

Flow cytometry analysis of Limbal MMSC at passage 4

Анализируемые маркеры	Уровень экспрессии, %
CD105	99,5
CD90	98,0
CD133	5,2
CD19	7,7
CD73	90,0

роко используется для фенотипирования ММСК, экспрессируется пролиферирующими клетками; CD73 – 5'-нуклеотидаза, CD133 – проминин-1, антиген гемопоэтических стволовых клеток; CD19 – В-лимфоцитарный антиген [36].

Полученная культура клеток лимба экспрессировала характерные для ММСК костного мозга маркеры (CD 105, CD90, CD73), практически не экспрессировала маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного ряда (CD19, CD133) (табл. 1).

При культивировании 2D-культуры ММСК лимба в индукционной среде наблюдали изменение морфологии клеток в сторону приобретения нейронального фенотипа (рис. 2).

Индукцированные и интактные ММСК лимба 4-го пассажа переводили в условия 3D-культивирования в агарозных планшетах для получения клеточных сфероидов, позволяющие в каждой лунке планшета получать стандартные сфероиды из одинакового количества клеток.

Установлено что 3D-культура клеток представляет собой сложную саморегулирующуюся систему, в формировании которой выделяют следующие этапы: 1) фаза экспоненциального роста; 2) фаза линейного роста; 3) фаза формирования дормантного «дремлющего» сфероида, характеризующаяся наличием небольшого количества митотирующих клеток на поверхности, обеспечивающих равновесие сформированной 3D-системы [37].

Нами было установлено, что в контрольной группе, созданной из интактных ММСК, уже в пер-

вые часы инкубирования клетки объединялись в агрегаты (рис. 3, а, б), которые к концу 7-х суток формировали компактные, плотные сфероиды с гладким поверхностным слоем (рис. 3, в). Дальнейшая экспозиция клеток в 3D-культуре не приводила к каким-либо морфологическим изменениям сфероидов (рис. 3, г).

Во II группе сфероидов, созданных из индуцированной 2D-культуры ММСК, процесс протекал идентично (рис. 4).

В III группе после 1-го этапа индукции, на 4-е сутки, сфероиды приобретали выраженную «бугристость» (рис. 5, б), что, возможно, было обусловлено стимуляцией пролиферативной активности клеток. Известно, что EGF, hbFGF, входящие в состав индукционной среды, являются мощными стимуляторами роста и пролиферации клеток. Применение дибутирил-цАМФ и 3-изобутил-1-метилксантина на II этапе способствует значительному повышению содержания внутриклеточного цАМФ и дифференцировке клеток в нейрональном направлении.

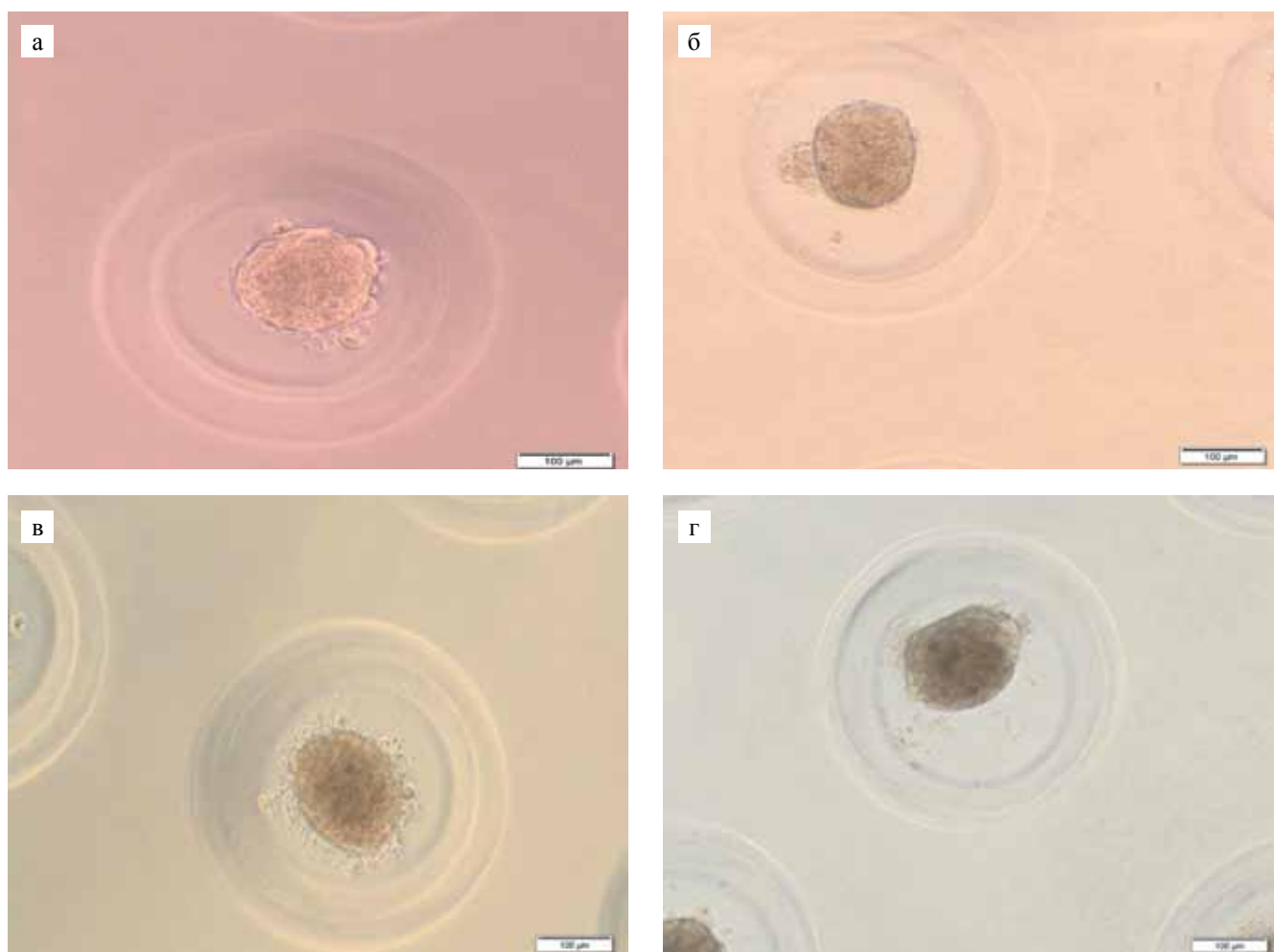


Рис. 3. 3D-культура ММСК, I группа, контроль: а – 1-е сутки; б – 4-е сутки; в – 7-е сутки; г – 21-е сутки культивирования. Световая микроскопия. ×100

Fig. 3. Phase contrast image of I group of 3D spheroids of limbal MMSC at 1 day (a); 4 day (б); 7 day (в) and 21 days of cultivation (г), scale bars, 100 µm

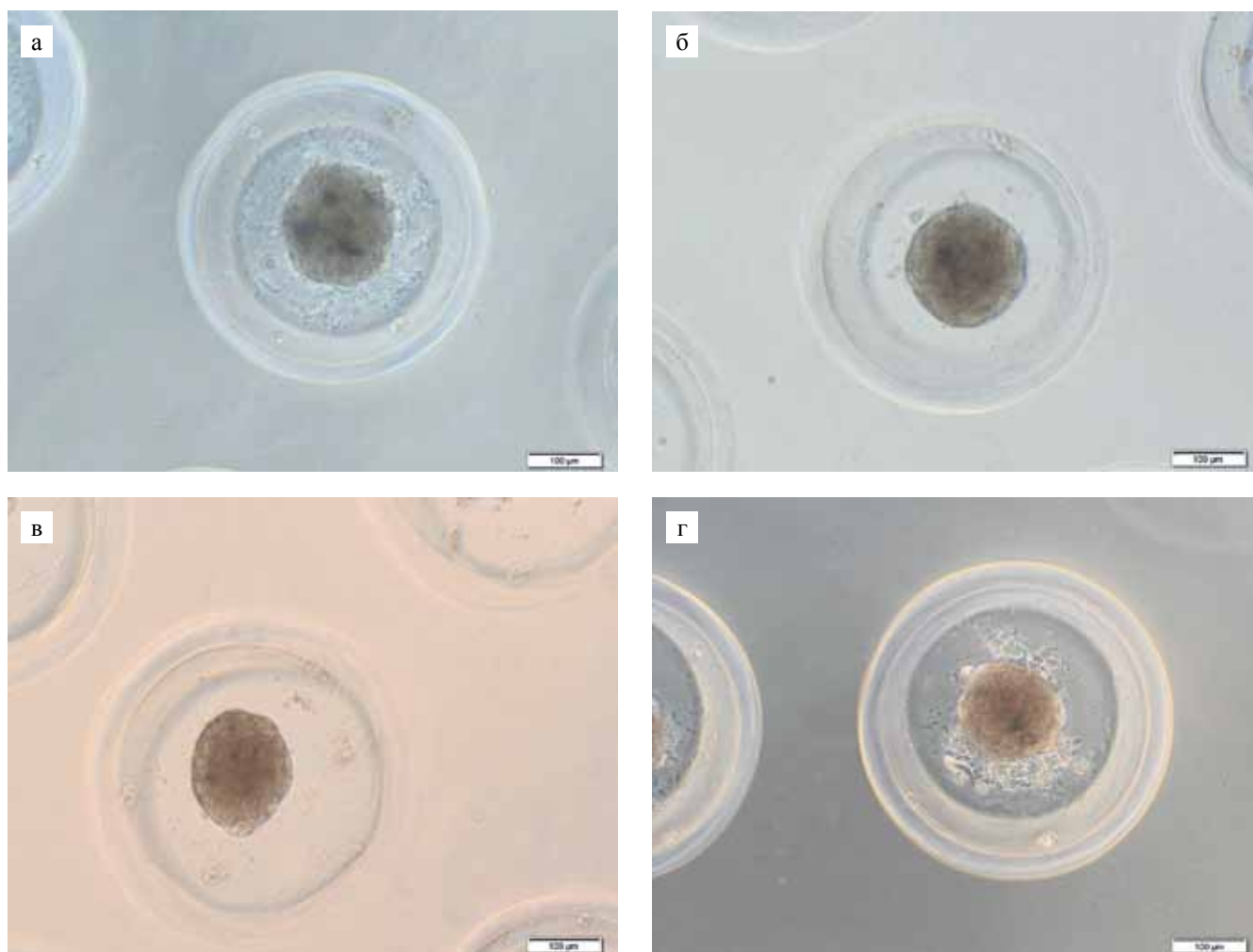


Рис. 4. 3D-культура ММСК, II группа, созданная из индуцированной 2D-культуры ММСК: а – 1-е сутки; б – 4-е сутки; в – 7-е сутки; г – 21-е сутки культивирования. Световая микроскопия. $\times 100$

Fig. 4. Phase contrast image of II group of 3D spheroids of limbal MMSC at 1 day (a); 4 day (б); 7 day (в) and 21 days of cultivation (г), scale bars, 100 μm

Однако после проведения второго этапа индукции отмечалось разрыхление клеточного конгломерата, потеря компактности и появление клеточного дебриса «бахромчатости» (рис. 5, в), являющегося косвенным свидетельством нежизнеспособности полученных конструкций.

Возможно, применяемые факторы индукции вносят непоправимые изменения в тонкую систему формирующегося сфероиды, приводя в конечном итоге к его гибели.

Одним из критериев жизнеспособности сфероидов является их способность к адгезии. В I и II группе при 2D-культивировании в первые сутки сфероиды прикреплялись к поверхности дна лунок культуральных планшетов и в течение последующих дней «распластывались» с образованием слоя клеток вокруг изначальной зоны их прикрепления (рис. 6, а, б). В III группе адгезия отсутствовала (рис. 6, в).

Таким образом, несмотря на литературные данные о необходимости стимуляции плоскостных 2D-культур, для 3D-сфероидов впервые было выявлено отрицательное влияние предложенных индукторов на жизнеспособность клеток.

Динамика содержания нейротрофических факторов ФРН и НФГМ в инкубационной среде по группам исследования представлена в табл. 2 и 3.

Так, уровень секреции ФРН в I группе оставался стабильным на протяжении всего периода наблюдения и составлял в среднем 11785 ± 389 пг/мл. Во II группе, созданной из индуцированной 2D-культуры ММСК, также отмечался стабильный уровень секреции, но был в 2,2 раза меньше по сравнению с группой контроля. В III группе проведение индукции способствовало увеличению секреция ФРН в 1,6 раза и составляло в среднем $19102 \pm 135,5$ и $19490 \pm 155,9$ пг/мл соответственно. При этом после индукции отмечалось выраженное снижение продукции ФРН в 2 раза, и к 21-м суткам его концент-

рация составляла $4500 \pm 150,9$ пг/мл, что было в 2,5 раза меньше по сравнению с I группой контроля.

При оценке динамики содержания НФГМ в культуральной жидкости в I группе отмечалось умерен-

ное снижение уровня фактора лишь к концу периода наблюдения: к 21-м суткам концентрация составляла $461,59 \pm 23,09$ пг/мл. Во II группе также отмечалось умеренное снижение уровня фактора, но

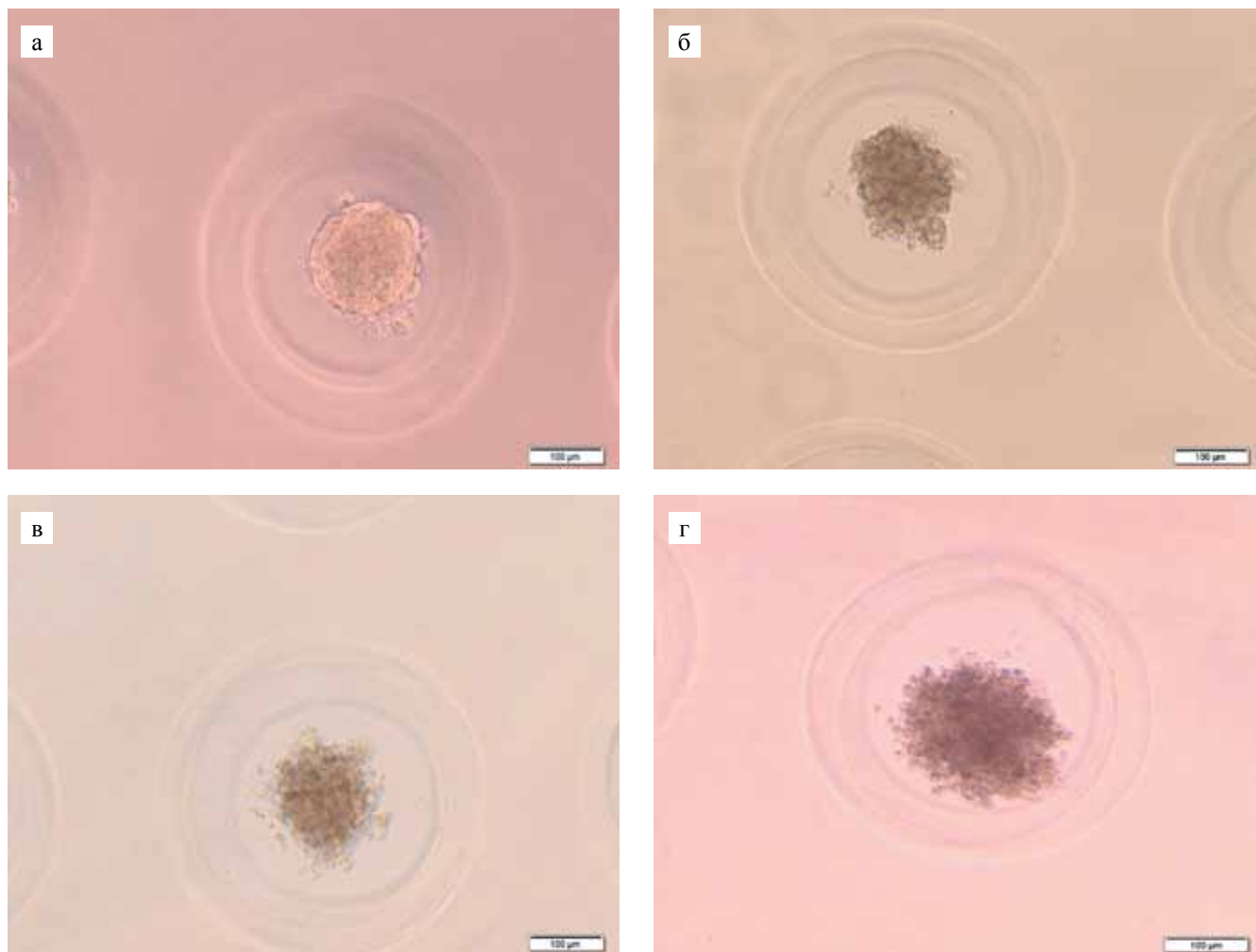


Рис. 5. 3D-культура ММСК, III группа, индукция на 1-е сутки культивирования: а – 1-е сутки; б – 4-е сутки; в – 7-е сутки; г – 21-е сутки. Световая микроскопия. $\times 100$

Fig. 5. Phase contrast image of III group of 3D spheroids of limbal MMSC at 1 day (a); 4 day (б); 7 day (в) and 21 days of cultivation (г), scale bars, 100 µm

Таблица 2

Динамика содержания ФРН в инкубационной среде в группах сравнения

Dynamics of NGF in cultivation medium in the comparison groups

Период наблюдения, сутки	ФРН, пг/мл		
	I группа M ± σ	II группа M ± σ	III группа M ± σ
5	11420 ± 245,2	4150 ± 115,5*	14475 ± 201,7*
7	11760 ± 132,9	5050 ± 124,7*	19102 ± 135,5*
9	12190 ± 205,2	5550 ± 122,5*	12470 ± 156,3**
11	12230 ± 201,6	6525 ± 156,7*	9775 ± 168,7 *
14	12060 ± 252,5	5565 ± 122,6*	8200 ± 181*
17	11610 ± 126,5	4983 ± 137*	5230 ± 223,7*
21	11230 ± 133,7	4338 ± 108,3*	4500 ± 150,9*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с I группой; ** – $p > 0,05$ по сравнению с I группой.

уровень секреции был статистически ниже по сравнению с группой контроля. Индукция в III группе способствовала увеличению содержания НФГМ в 1,5 раза и составляла в среднем $870,7 \pm 20,2$ пг/мл.

Однако в дальнейшем отмечалось выраженное снижение продукции в 3,4 раза и к 21-м суткам соответствовало $250,5 \pm 18,9$ пг/мл, что было в 1,4 раза меньше по сравнению с группой контроля.

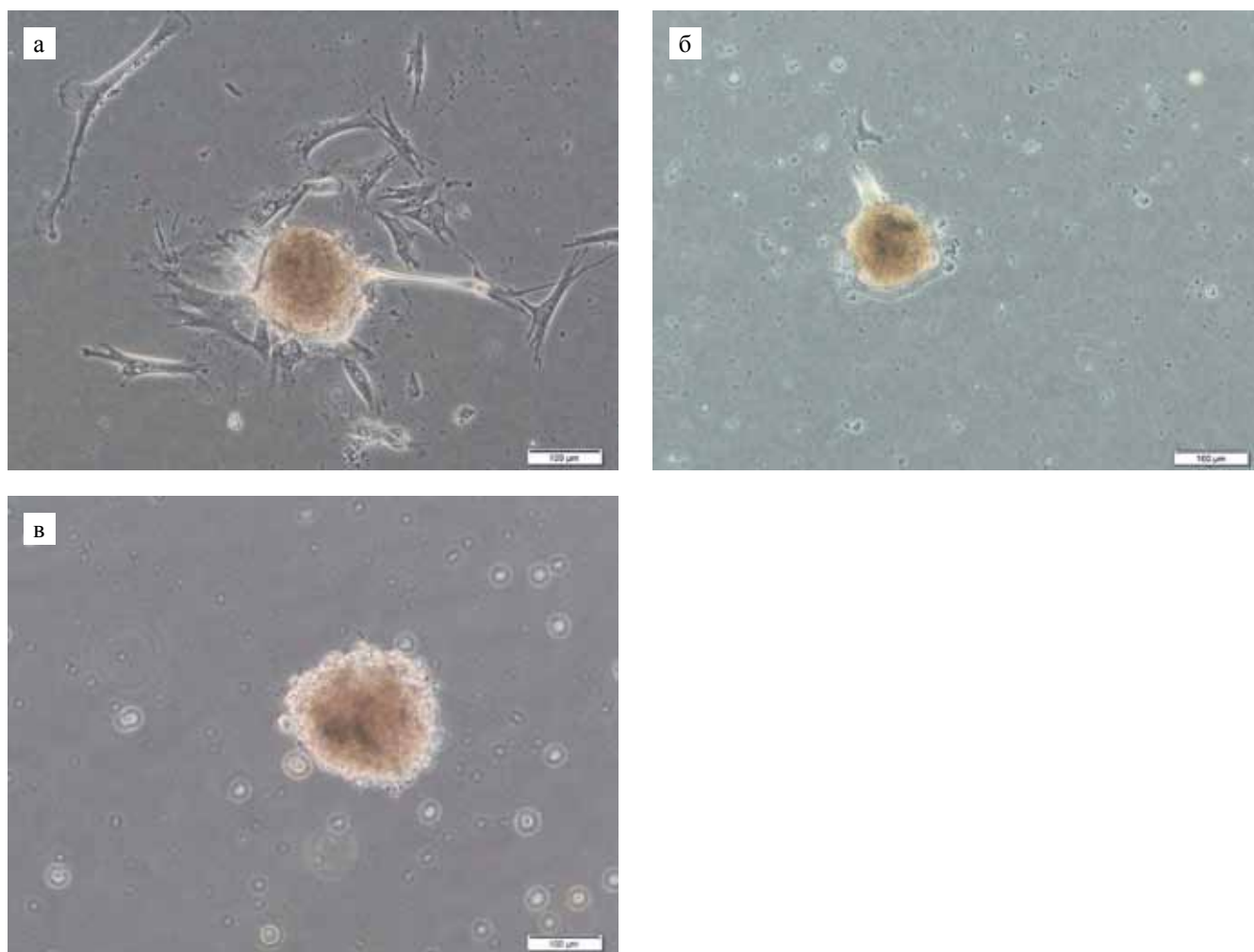


Рис. 6. Сфероиды ММСК лимба в условиях 2D-культивирования, 7-е сутки: а – I, интактная группа; б – II группа; в – III группа. Световая микроскопия. $\times 100$

Fig. 6. Phase contrast image of 3D spheroids of limbal MMSC, adhesion on plastic I group (a); II group (б); III group (в), scale bars, 100 μm

Таблица 3

Динамика содержания НФГМ в инкубационной среде в группах сравнения
Dynamics of BDNF in cultivation medium in the comparison groups

Период наблюдения, сутки	НФГМ, пг/мл		
	I группа M \pm σ	II группа M \pm σ	III группа M \pm σ
5	590,58 \pm 22,3	574 \pm 13,3*	680,25 \pm 19*
7	583 \pm 20,57	535 \pm 23,3*	870,7 \pm 20,2*
9	559,5 \pm 24,5	537 \pm 15,5*	703,5 \pm 21,8*
11	537,4 \pm 31,6	509 \pm 11,2*	617,2 \pm 21,5*
14	500 \pm 16,32	494 \pm 16,2**	521,8 \pm 23,1*
17	488,26 \pm 27,1	468 \pm 17**	434,4 \pm 27,3*
21	461,59 \pm 23,09	422,5 \pm 10,86*	250,5 \pm 18,9

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с I группой; ** – $p > 0,05$ по сравнению с I группой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные сфероиды, созданные из 2D-культуры интактных ММСК лимба методом трехмерного культивирования, способны спонтанно синтезировать ФРН и НФГМ на протяжении длительного времени, как минимум в течение 21 суток, и являются наиболее оптимальной конструкцией для трансплантации в экстрабульбарные и интраокулярные тканевые ниши глазного яблока в клеточной терапии оптических нейропатий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бровкина АФ, Щуко ГА. О дифференциальной диагностике некоторых видов оптической нейропатии. *Клиническая офтальмология (ПМЖ)*. 2008; 1: 30–33. Brovkina AF, Schuko AG. On differentiated diagnostics of some types of optical neuropathy. *Klinicheskaja oftal'mologija (RMZh)*. 2008; 1: 30–33.
2. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.* 2006; 90 (3): 262–267. doi: 10.1136/bjo.2005.081224.
3. *EGS Terminology and Guidelines for Glaucoma (3rd Edition)*. Italy. DOGMA. 2008. 184 p.
4. Conforti L, Adalbert R, Coleman MP. Neuronal death: where does the end begin? *Trends Neurosci.* 2007; 30 (4): 159–166. doi: 10.1016/j.tins.2007.02.004.
5. Алексеев ВН, Газизова ИР, Никитин ДН. Морфологические особенности центральных отделов зрительного анализатора при экспериментальной глаукоме. *Сб. науч. трудов по материалам конференции «Современные технологии диагностики и лечения при поражениях органа зрения»*. СПб.: ВМедА, 2013: 13–14. Alekseev VN, Gazizova IR, Nikitin DN. Morfologicheskie osobennosti central'nyh otdelov zritel'nogo analizatora pri jeksperimental'noj glaukome. *Cb. nauch. trudov po materialam konferencii «Sovremennye tehnologii diagnostiki i lechenija pri porazhenijah organa zrenija»*. SPb.: VMedA, 2013: 13–14.
6. Gupta N, Yucel YH. Glaucoma and the brain. *J. Glaucoma.* 2001; 10: 28–29. PMID: 11890268.
7. Garaci FG, Bolacchi F, Cerulli A, Melis M, Spanò A, Cedrone C et al. Optic Nerve and Optic Radiation Neurodegeneration in Patients with Glaucoma: *In vivo* Analysis with 3-T Diffusion-Tensor MR Imaging. *Radiol.* 2009; 2: 496–501. doi: 10.1148/radiol.2522081240.
8. Gupta N, Yucel YH. Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 2007; 2: 110–114. doi: 10.1097/ICU.0b013e3280895aea.
9. Levkovitch-Verbin H; Quigley HA; Kerrigan-Baumrind LA; D'Anna SA; Kerrigan D; Pease ME. Optic Nerve Transection in Monkeys May Result in Secondary Degeneration of Retinal Ganglion Cell. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2001; 42: 975–982. PMID: 11274074.
10. Macaya A. Apoptosis in the nervous system. *Rev-Neurol.* 1996; 135: 1356–1360. PMID: 8974737.
11. Schwartz M. Neurodegeneration and Neuroprotection in Glaucoma: Development of a Therapeutic Neuroprotective Vaccine. *Investigative Ophthalmology & Visual Science (The Friedenwald Lecture)*. April 2003; 44 (4): 1407–1411. doi: 10.1167/iovs.02-0594.
12. Ярилин АА. Апоптоз и его роль в целостном организме. *Глаукома*. 2003; 2: 46–54. Jarilin AA. Apoptoz i ego rol' v celostnom organizme. *Glaukoma*. 2003; 2: 46–54.
13. Goodin S. Erlotinib: optimizing therapy with predictors of response? *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 2961–2963. PMID: 16707589. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0426.
14. Chatterjee S, Matsumura A, Schradermeier J, Gillespie GY. Human malignant glioma therapy using anti-alpha (v) beta3 integrin agents. *J. Neurooncol.* 2000; 46: 135–144. PMID: 10894366.
15. Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI. Neuroprotection by a caspase inhibition in acute bacterial meningitis. *Nat. Med.* 1999; 5: 298–302. PMID: 10086385. doi: 10.1038/6514.
16. Green AR. Pharmacological approaches to acute ischemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 153 (1): 325–338. PMID: 18059324. doi: 10.1038/sj.bjp.0707594.
17. Deshmukh M, Vasilakos J, Deckwerth TL, Lampe PA, Shivers BD, Johnson EM Jr. Genetic and metabolic status of NGF-deprived sympathetic neurons saved by an inhibitor of ICE family proteases. *J. Cell. Biol.* 1996; 135 (5): 1341–1354. PMID 8947555.
18. Гомазков ОА. Старение мозга и нейротрофическая терапия. М.: ИКАР, 2011. 92. Gomazkov OA. Starenie mozga i nejrotroficheskaja terapija. M.: IKAR, 2011. 92.
19. Agarwal N, Agarwal R, Kumar DM, Ondricek A, Clark AF, Wordinger RJ et al. Comparison of expression profile of neurotrophins and their receptors in primary and transformed rat retinal ganglion cells. *Molecular Vision.* 2007; 13: 1311–1318. PMID: 17679933
20. Lambert W, Agarwal R, Howe W, Clark AF, Wordinger RJ. Neurotrophin and neurotrophin receptor expression by cells of the human lamina cribrosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42 (10): 2315–2323. PMID: 11527945
21. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 299–309. PMID: 12671646. doi: 10.1038/nrn1078.
22. Rudzinski M, Wong TP, Saragovi HU. Changes in Retinal Expression of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors Induced by Ocular Hypertension. *J. Neurobiol.* 2004; 58 (3): 341–354. PMID: 14750147. doi: 10.1002/neu.10293.
23. Harper MM, Grozdanic SD, Blits B, Kuehn MH, Zamzow D, Buss JE, Randy H. Kardon et al. Transplantation of BDNF-Secreting Mesenchymal Stem Cells Provides Neuroprotection in Chronically Hypertensive Rat Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2011; 52: 4506–4515. PMID: 21498611. doi: 10.1167/iovs.11-7346.
24. Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC, Chen CF. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive

- eyes of rats. *Neurosci Lett.* 2001; 305: 139–142. PMID: 11376903. doi: org/10.1016/S0304-3940(01)01830-4.
25. Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D et al. Gene Therapy with Brain-Derived Neurotrophic Factor As a Protection: Retinal Ganglion Cells in a Rat Glaucoma Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2003; 44 (10): 4357–4365. PMID: 14507880. doi: 10.1167/iovs.02-1332.
 26. Lambiase A, Centofanti M, Micera A, Manni GL, Mattei E, De Gregorio A et al. Nerve growth factor (NGF) reduces and NGF antibody exacerbates retinal damage induced in rabbit by experimental ocular hypertension. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1997; 235 (12): 780–785. PMID: 9439971.
 27. Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G. Nerve Growth Factor Promotes Functional Recovery of Retinal Ganglion Cells After Ischemia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1993; 34 (12): 3232–3245. PMID: 8225858.
 28. Lambiase A, Tirassa P, Micera A, Aloe L, Bonini S. Pharmacokinetics of Conjunctivally Applied Nerve Growth Factor in the Retina and Optic Nerve of Adult Rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2005; 46 (10): 3800–3806. PMID: 16186366. doi: 10.1167/iovs.05-0301.
 29. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp. Neurol.* 2006; 198 (1): 54–64. PMID: 16336965. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.10.029.
 30. Hu Y, Tan HB, Wang XM, Rong H, Cui HP, Cui H. Bone marrow mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma. *Clinical Interventions in Aging.* 2013; 8: 1467–1470. PMID: 24204132. doi: 10.2147/CIA.S47350.
 31. Борзенко СА, Сабурин ИИ, Репин ВС, Кошелева НВ, Горкун АА, Комах ЮА и др. Методологические и технологические проблемы конструирования искусственной роговицы на базе 3D-клеточного культивирования. *Офтальмохирургия.* 2012; 4: 12–17. Borzenok SA, Saburina IN, Repin VS, Kosheleva NV, Gorkun AA, Komakh YuA et al. Methodological and technological problems of artificial cornea engineering based on 3D cellular cultivation. *Oftal'mokhirurgiya. = Ophthalmosurgery.* 2012; 4: 12–17.
 32. Борзенко СА, Онищенко НА, Тонаева ХД, Комах ЮА, Ковшун ЕВ, Струсова НА. Сотрансплантация ММСК-подобных клеток лимба способствует местной иммунокоррекции и прозрачному приживлению трансплантата роговицы при кератопластике высокого риска. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014; XVI (1): 12–20. Borzenok SA, Onishchenko NA, Tonaeva KhD, Komakh YA, Kovshun YV, Strusova NA. MMSC-Like limbal cells cotransplantation promotes local immunocorrection and corneal graft transparent retention in high risk keratoplasty. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov. = Russian Journal of transplantology and artificial organs.* 2014; XVI (1): 12–20.
 33. Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Sangwan VS, Vemuganti GK. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol Vis.* 2008; 14: 431–442. PMID: 18334960.
 34. Способ выделения и органотипического культивирования аллогенного лимбального трансплантата. Патент РФ № 2475218 / Борзенко С.А., Малюгин Б.Э., Тонаева Х.Д., Онищенко Н.А., Комах Ю.А., Ковшун Е.В.; Заявитель и патентообладатель ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России; заявл. 06.12.2011 г.; опубл. 20.02.2013 г. Бюл. 2013; 5. 13. Sposob vydeleniya i organotipicheskogo kul'tivirovaniya allogennogo limbal'nogo transplantata. Patent RF № 2475218 / Borzenok S.A., Mal'yugin B.E., Tonaeva H.D., Onishchenko N.A., Komakh Yu.A., Kovshun E.V.; Zayavitel' i patentoobladatel' FGAU «MNTK «Mikrohirurgiya glaza» im. akad. S.N. Fedorova» Minzdrava Rossii; zayavl. 06.12.2011 g.; opubl. 20.02.2013 g. Byul. 2013; 5. 13.
 35. Sadan O, Bahat-Stromza M, Barhum Y, Levy YS, Pisnevsky A, Peretz H et al. Protective effects of neurotrophic factors secreting cells in a 6OHDA rat model of Parkinson disease. *Stem. Cells Dev.* 2009; 18 (8): 1179–1190. PMID: 19243240. doi: 10.1089/scd.2008.0411.
 36. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8 (4): 315–317. PMID: 16923606. doi: 10.1080/14653240600855905.
 37. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J. Exp. Med.* 1973; 138 (4): 745–753.

Статья поступила в редакцию 11.11.2016 г.
The article was submitted to the journal on 11.11.2016