DOI: 10.23868/201912029

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУР СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА И СОЗДАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОГО КОМПОЗИТА СО СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

З.Б. Квачева[1], И.Б. Василевич[1], А.Ю. Чекина[2], Л.Н. Марченко[2], М.Ф. Джумова[2], С.В. Пинчук[1], А.С. Федулов[2], И.Д. Волотовский[1]

[1] *Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*
[2] *Беларусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

A COMPARATIVE ANALYSIS OF CULTIVATION TECHNIQUES OF EPITHELIAL STEM CELLS OF CORNEA AND CREATION OF BIOMEDICAL CELL PRODUCT (BIOCOMPOSITE) ON THE BASIS BIOCOMPATIBLE MATRIX AND STEM CELLS

Z.B Kvacheva[1], I.B. Vasilevich[1], A.Y. Chekina[2], L.N. Marchenko[2], M F. Dzhumova[2], C.V. Pinchuk[1], A.S. Fedulov[2], I.D. Volotovski[1]

[1] *Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus, Minsk, Belarus*
[2] *Belarus State Medical University, Minsk, Belarus*

e-mail: volotovski@yahoo.com

В последние годы аутогенные стволовые клетки переднего эпителия роговицы все шире исследуются для лечения дегенеративных заболеваний этой прозрачной части наружной оболочки глаза человека. В качестве специализированного депо данных клеток в органе зрения рассматривается лимб. Разработано несколько способов выделения стволовых клеток из эпителия лимба роговицы и их культивирования in vitro.

Цель работы: проанализировать возможности двух методов получения культур эпителиальных стволовых клеток переднего эпителия роговицы (СКР) — эксплантного и суспензионного, по критериям эффективности пролиферации, временных затрат и постоянства морфофункциональных параметров клеточной культуры, изучить биосовместимость СКР с офтальмологическими гелевыми препаратами для использования в составе биокомпозита, пригодного к применению в клинической практике.

Первичные монослойные культуры СКР были получены двумя методами (эксплантным и суспензионным) из биоптатов неповрежденного участка лимба роговицы 10 пациентов в возрасте от 39 до 73 лет, страдающих различными видами кератопатий. При сравнительном анализе культур СКР исследовали морфологию клеток, определяли их жизнеспособность, пролиферативный потенциал и иммунофенотип.

Было показано, что эксплантный метод является более эффективным по сравнению с суспензионным, поскольку позволяет в более короткие сроки нарастить значительное количество клеток с эпителиоподобной морфологией. Популяция клеток была представлена преимущественно эпителиальными СКР: 95% клеток синтезировали белок K19. Индекс пролиферации СКР, выделенных эксплантным методом, составлял 3,5–4,0, время удвоения популяции при культивировании в среде DMEM/F12 с 10 нг/мл ЭФР — 48 ч. С помощью эксплантного метода из одного биоптата лимба (1×2 мм) получали биомассу СКР в количестве 4,0±1,2 млн клеток в течение 3–4 недель (1–2 пассажей).

При исследовании ряда коммерческих гелевых препаратов на биосовместимость с клетками препарат Провиск оказался лучшим по этому показателю, что дает возможность рекомендовать его в качестве носителя для клеток при изготовлении биомедицинских клеточных продуктов.

Ключевые слова: культура эпителиальных стволовых клеток переднего эпителия роговицы, жизнеспособность, пролиферативная активность, фенотип клеток, биомедицинский клеточный продукт, биокомпозит, лимбальная недостаточность, кератопатии.

In recent years the autologous stem cells of front cornea epithelium (CSC) are increasingly used in the treatment of degenerative diseases of this transparent part of the outer shell of the eye. Limb is considered as a specialized storage for these cells in eye. A number of techniques for isolation of stem cells from limb epithelium and their cultivation *in vitro* were developed.

Goal of the work: To analyze the possibilities of two methods of cultivation of epithelial stem cells front epithelium of cornea (CSC), explants and suspension ones by criteria of efficiency of proliferation, time consumption and constancy of morphology and function parameters of cell cultures. To study of biocompatibility of CSC with commercial gel preparations for its application as an ingredient of biocomposite to use in clinical practice.

The primary multilayer CSC cultures were obtained by two methods (explant and suspension) from biopsies of intact parts of cornea limb of 10 patients at the age from 39 to 73 years suffering different types of ceratopathies. Under comparative analysis of CSC cultures their viability, proliferation potential and immunophenotype were investigated.

It was shown that explant method is more effective as compared with suspension one as it allows to gain the significant amount of cells with epithelium like morphology. The cell population was presented primarily by epithelium CSC: 95% of cells synthesized K19$^+$ protein. CSC proliferation index of cells isolated by explant method was by 3.5–4 times higher, the time of doubling of population at cultivation in DMEM/F12 medium with 10 ng/ml of EGF was 48 h. Using explant method from one limb biopsy (1×2 mm) a biomass of CSC in amount of 4 ± 1,2 mln during 3–4 weeks (1–2 passages) was obtained.

It was show under investigation for biocompatibility of cells with a number of commercial gel preparations that preparation Provisk is the best on this indicator and this allows to recommend it as a carrier for cells when biomedical cell product are produced.

Keywords: culture of epithelial stem cells of front epithelium of cornea, viability, proliferation activity, cell phenotype, biomedical cell product, biocomposite, limbal deficiency, keratopaties.

Введение

Роговица покрывает фронтальную часть глазного бокала и ее прозрачность имеет чрезвычайно важное значение для беспрепятственного попадания света в глаз и достижения им сетчатки. Роговица состоит из пяти структурных слоев: переднего эпителия, наружной пограничной пластинки, соединительнотканной стромы, задней пограничной пластинки и эпителия на внутренней поверхности роговицы. Прозрачность роговицы обеспечивается однородностью эпителиальных клеток, отсутствием в ней кровеносных сосудов и уникальностью стромы, построенной из коллагеновых волокон. При повреждении и гибели переднего эпителия происходит его регенерация за счет регионарных стволовых клеток

(СК), депонированных на периферии роговицы, в области, которая называется лимбом [1–3]. Лимб выступает также в роли физического барьера, отделяющего прозрачную роговицу от окружающей конъюнктивы и сосудистой сети, покрывающей склеру.

Специфические маркеры для идентификации СК переднего эпителия роговицы в настоящее время не выявлены [4]. Тем не менее, к их маркерам можно отнести такие белки, как транскрипционный фактор p63, интегрины b1, a9 и a6, рецепторы эпидермального фактора роста, трансферритиновый рецептор CD71, член семейства белков ABC транспортер ABCG2, а также цитоплазматические белки — цитокератин 19 (K19) и α-энолазу [4–10].

При некоторых патологических состояниях или травмах роговицы развивается синдром так называемой «лимбальной недостаточности» или кератопатия, что приводит к развитию дегенеративных структурно-функциональных изменений в роговице.

Лечение заболеваний роговицы глаза, включая кератопатии, предполагает выполнение реконструктивных вмешательств с использованием донорской роговицы [11, 12]. Однако продолжающая оставаться высокой частота отторжения донорских трансплантатов заставляет искать альтернативные методы лечения, в частности, с использованием СК эпителия лимба.

Первая попытка восстановления поврежденных поверхностей роговицы с помощью трансплантации аутогенных клеток эпителия была предпринята в 1997 г. G. Pellegrini с соавт. (1997) [13]. В настоящее время разработан ряд методик выделения и культивирования лимбальных эпителиальных клеток, а в качестве матрикса для клеток стали применять биодеградируемые носители. Заслуживает внимания ксено-бесфидерный метод выделения и наращивания лимбальных стромальных и эпителиальных СК роговицы человека [5].

В научной литературе описан ряд протоколов получения первичных монослойных культур эпителиальных СК — клеток-предшественниц, отличающихся способами их выделения и условиями культивирования [6, 14, 15]. В основном, исследователи применяют два метода: суспензионный и метод эксплантной культуры [5, 13, 16–19].

Имеющиеся технологии культивирования СК переднего эпителия роговицы (далее в тексте статьи для краткости, но без утраты смыслового содержания, будет использоваться аббревиатура СКР), позволяющие нарастить необходимое для достижения терапевтического эффекта количество СКР, а также способы создания на их основе биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), тем не менее, не лишены отдельных недостатков. Поэтому, наряду с изучением биологии и свойств СКР в условиях культуры, по-прежнему, остается актуальным сравнение эффективности выделения первичных монослойных культур СКР, по крайней мере, по двум отмеченным способам — суспензионному и эксплантному.

Целью данной работы явилось сравнение двух методов выделения и культивирования СКР — эксплантного и суспензионного, а также подбор биосовместимого носителя для их иммобилизации и создания БМКП для применения в лечебной практике.

Материал и методы

Дизайн эксперимента

Биоматериал для выделения первичных культур СКР был получен от 10 пациентов в возрасте от 39 до 73 лет, страдающих различными видами кератопатий, после получения информированного согласия. Забор биоптата (размерами 1×2 мм, глубиной 1 мм) проводили из неповрежденного участка лимба роговицы пациента, как правило, на 6- или 12-ч. меридианах, в условиях операционной, после чего обнаженный участок закрывали отсепарированным конъюнктивальным лоскутом с наложением на края раны двух швов. Биоптат помещали во флакон со стерильной питательной средой DMEM/F12 (Life Technologies, США), содержащей 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, США), и транспортировали в контейнере в лабораторию для культивирования клеток.

Первичные культуры из биоптатов получали двумя способами:

1 способ — суспензионный: биоптат из лимба роговицы обрабатывали трехкратно 0,1% раствором коллагеназы 1 типа (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин. для каждой обработки. После каждой обработки отбирали среду с клетками, отмывали от коллагеназы фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с последующим центрифугированием (1500 об/мин., 7 мин.). Осадок, содержащий порядка 5×10^5 клеток, ресуспендировали в ростовой среде и помещали в 25 см^2 флаконы (Corning, Greiner, США), дно которых было покрыто коллагеном 1 типа (Corning, Greiner, США);

2 способ — эксплантный: биоптат из лимба роговицы механически измельчали на фрагменты (1×1 мм), вносили в культуральные флаконы, дно которых было покрыто коллагеном 1 типа, и заливали ростовой средой.

Клетки культивировали в CO_2-инкубаторе (37°C, 5% CO_2) в ростовой среде следующего состава: питательная среда DMEM/F12 (Life Technologies, США), 5% фетальной телячьей сыворотки (ЭТС, HyClone, США), эпидермальный фактор роста (ЭФР) в концентрациях 5 или 10 нг/мл (Stem Cell Technology, США), инсулин-трансферрин-селенит (ITS, Sigma-Aldrich, США) и форсколин в концентрации 0,1 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). После формирования 70–90% конфлюэнтного монослоя клетки обрабатывали смесью 0,02% Версена и 0,25% трипсина (Gibco, Англия) в соотношении (1:1), пересевали в культуральные флаконы с ростовой средой и культивировали в течение 4–6 пассажей.

Эксперимент состоял из двух этапов: на первом этапе проводили сравнительный анализ культур СКР, полученных разными методами, по морфологии, иммунофенотипу, жизнеспособности клеток и пролиферативному потенциалу. При получении первичной монослойной культуры суспензионным методом оценивали адгезию клеток к субстрату, их пролиферацию и формирование монослоя, при получении первичной культуры эксплантным методом — скорость миграции клеток из эксплантa, пролиферацию и скорость формирования монослоя клеток с характерной морфологией (клетки полигональной формы). На втором этапе эксперимента изучали биосовместимость СКР с носителями.

Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности клеток

Критерием жизнеспособности клеток являлось состояние клеточных мембран, их барьерные свойства. С помощью окрашивания клеток 0,5% раствором трипанового синего определяли количество мертвых клеток, т.к. плазматическая мембрана жизнеспособных клеток непроницаема для красителей. Жизнеспособность клеток оценивали также по стабильности роста клеток в культуре при пассировании, пролиферативную активность — по индексу пролиферации (отношение количества выросших клеток к количеству посеянных) и времени удвоения клеточной популяции, которое определяли

по формуле: y=t:3,32×log(N:NO), где y — время удвоения популяции клеток; t — период времени роста культуры; N — конечное количество клеток; NO — начальное количество клеток [19].

Анализ морфологии и иммунофенотипа культивированных клеток

После 1 пассажа определяли стабильность эпителиоподобной морфологии и иммунофенотип [19]. Морфологию клеток анализировали в период их роста до формирования монослоя с использованием световой и фазово-контрастной микроскопии (Olympus CKX 41, Япония). Фенотип клеток определяли с помощью прямого метода окраски флуоресцентными антителами, меченными FITC, к маркеру K19, нестину (Abcam, США), и меченными Alexa Fluor 488 (R&D Systems, США) к белку p63, с использованием микроскопа Olympus IX71 (Япония), согласно инструкции фирмы-производителя.

Исследование биосовместимости СКР с носителями

В качестве носителей для иммобилизации клеток изучали используемые в офтальмологии глазные гели: Корнерегель (Герхард Манн, Германия), содержащий 5% декспантенола и карбомер (полимер на основе акриловой кислоты); Видисик (Герхард Манн, Германия) — на основе 0,2% карбомера, содержащий цетрамид и сорбитол; Офтагель (Урсафарм Арцнаймиттель, Германия) — на основе 0,25% карбомера, содержащий хлорид бензалкония, сорбитол, моногидрат лизина, ацетат натрия и поливиниловый спирт; и офтальмологические вискохирургические изделия: Вискот (Алькон-Куврер, Бельгия) — фракция хондроитин сульфата натрия и натрия гиалуроната и Провиск (Алькон-Куврер, Бельгия) — фракция гиалуроната натрия, растворенная в физиологическом фосфатном буфере хлорида натрия.

При исследования биосовместимости СКР с носителями клетки снимали с подложки, суспендировали в ФСБ, 0,2 мл ФСБ, содержащего 2×10^5 клеток, смешивали с 0,2 мл носителя, предварительно нагретого до 37°С, аккуратно перемешивали и инкубировали в термостате при 37°С в течение 1, 3, 4 и 20 ч. Для определения жизнеспособности СКР 40 мкл суспензии клеток с носителем смешивали с 360 мкл ФСБ, содержащего 0,5 мкг/мл флуоресцеиндиацетата (ФДА) (Sigma, США) и 5 мкг/мл пропидиум иодида (PI) (Sigma, США), образцы переносили в чашки Петри, инкубировали в течение 10 мин. в темноте при комнатной температуре и анализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus IX71 (Япония), используя для возбуждения «зеленой» флуоресценции (505–560 нм) излучение в области 420–495 нм, а для возбуждения «красной» флуоресценции (620–720 нм) излучение в области 520–580 нм. Изображения регистрировали цифровой камерой DP72 (Япония) и изучали с помощью программного обеспечения Cell F (Olympus, Япония). Жизнеспособные клетки интенсивно флуоресцировали в зеленой области спектра, некротические — в красной. Контролем служили клетки, инкубированные в ФСБ без носителей.

Статистический анализ

Результаты анализировали с использованием приложения Microsoft Excel и программы Statistica 6,0, выражали в виде средних арифметических значений и среднего квадратичного отклонения. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Характеристика культур СКР, полученных суспензионным и эксплантным способами

Анализ литературных данных показал, что единый стандартный протокол получения культур СКР отсутствует, а описанные методики культивирования не лишены недостатков. В связи с этим, было проведено сравнительное исследование 2 основных способов получения первичных монослойных культур СКР: суспензионного и эксплантного. Согласно различным протоколам культивирования в питательную среду в качестве стимулятора цАМФ для повышения уровня метаболического и энергетического статуса клеток добавляют холерный токсин, что в научных целях оправдано, но при культивировании СКР для приготовления БМКП его использовать нельзя, поэтому в нашей работе вместо холерного токсина в ростовую среду добавляли форсколин — биологически активное нетоксическое соединение дитерпен (выделяют из растения *Coleus forskolii)*, которое повышает уровень цАМФ [20]. В настоящее время форсколин активно применяют в смеси с другими веществами для дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в нейрогенном направлении. В доступной литературе мы не нашли данных об использовании форсколина в составе ростовой среды для получения культур эпителиальных СКР.

Критерием оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток на этапе получения первичной культуры служила эффективность формирования монослоя клеток с эпителиоподобной морфологией. Через 3–5 сут. после посева более интенсивный рост клеток с эпителиоподобной морфологией наблюдался при культивировании эксплантов (рис. 1А). Мигрующие из эксплантов эпителиоподобные клетки пролиферировали, формировали колонии клеток и к 10–14 сут. образовывали конфлюентный монослой (рис. 1Б, В). В эти же сроки в первичных культурах, выделенных суспензионным способом, кроме эпителиоподобных клеток, появлялись фибробластоподобные клетки, и монослой эпителиоподобных клеток не сформировался (рис. 2). Сроки формирования монослоя в первичных эксплантных культурах (10–14 сут.) при культивировании в ростовой среде с форсколином, согласуются с данными других исследователей, использовавших в качестве добавки холерный токсин [5, 12, 16].

Эксплантным методом из биоптатов лимба роговицы 10 пациентов было выделено 8 первичных монослойных культур СКР. Пролиферативная активность клеток, выраженная индексом пролиферации, составляла 3,5–4,0. Время удвоения клеточной популяции зависело от концентрации ЭФР в ростовой среде и равнялось 56 и 48 ч. при концентрациях 5 и 10 нг/мл, соответственно. Из биоптата лимба размером 1×2 мм удалось нарастить в течение 1 мес. (1–2 пассажа) 4,0±1,2 млн СКР.

Популяция эпителиоподобных СКР, полученных эксплантным методом, на ранних пассажах (1–2 пассаж) была представлена несколькими морфотипами: преимущественно крупными клетками кубовидной (полигональной) формы, клетками такой же формы, но меньших размеров и округлыми клетками без отростков (рис. 1Г). Кроме эпителиоподобных клеток, в культуре СКР присутствовало небольшое количество (около 2,5–3%) удлиненных фибробластоподобных клеток с отростками, которые, по всей вероятности, основываясь на литературных данных, можно отнести к мезенхимальным стромальным клеткам роговицы [21, 22]. При длительном культивировании (4–6 пассажей) происходило замещение эпителиоподобных клеток на фибробластоподобные.

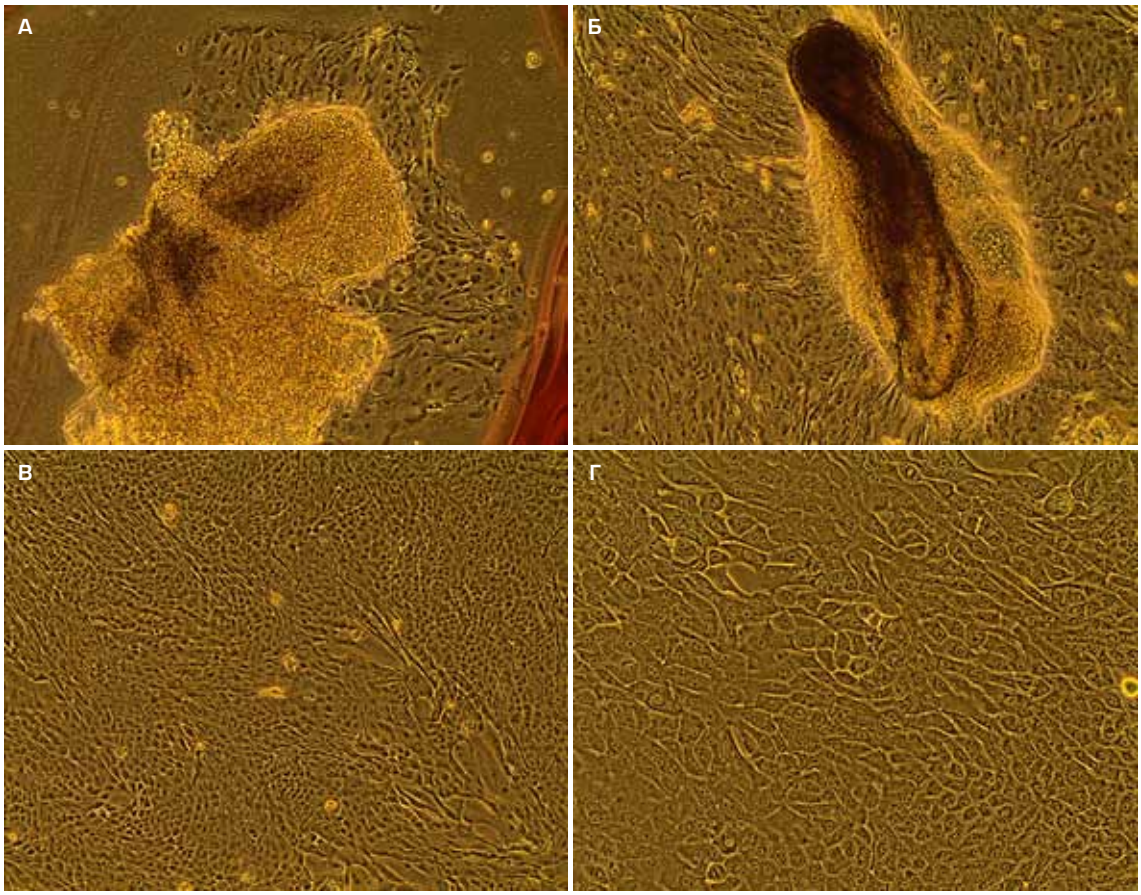

Рис. 1. Культуры СКР, полученные из биоптата лимба эксплантным методом, на разных сроках культивирования: А — первичная культура, 5 сут., Б — первичная культура, 10 сут., В — первичная культура, 14 сут.; Г — культура СКР, 1 пассаж. Фазово-контрастная микроскопия. Ув.: А-В ×40, Г ×100

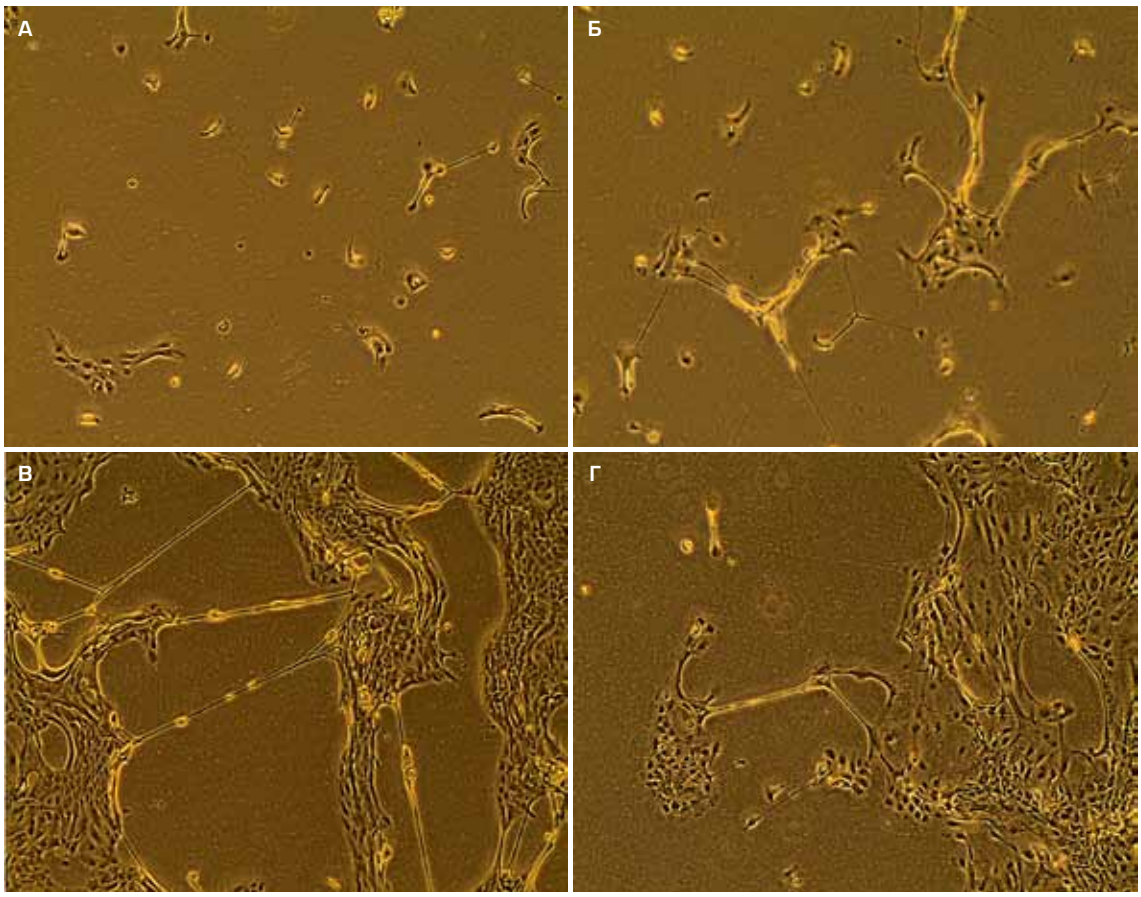

Рис. 2. Первичные культуры СКР, полученные из биоптата лимба суспензионным методом, на разных сроках культивирования: А — 3 сут., Б — 5 сут., В — 10 сут., Г — 14 сут. Фазово-контрастная микроскопия. Ув. ×40

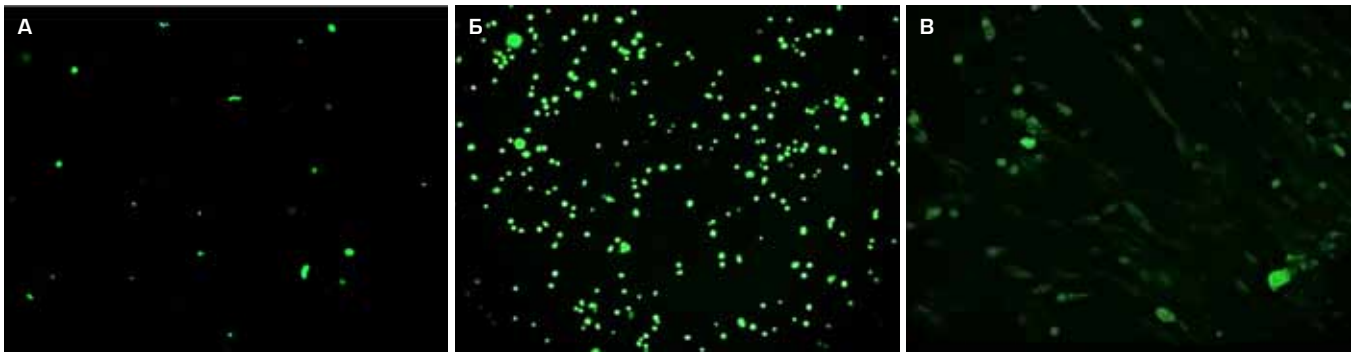

Рис. 3. Иммунофенотип СКР: А — антитела к p63, меченные Alexa Fluor 488; Б — антитела к K19, меченные FITC; В — антитела к нестину, меченные FITC. Флуоресцентная микроскопия. А, Б ×40, В ×200

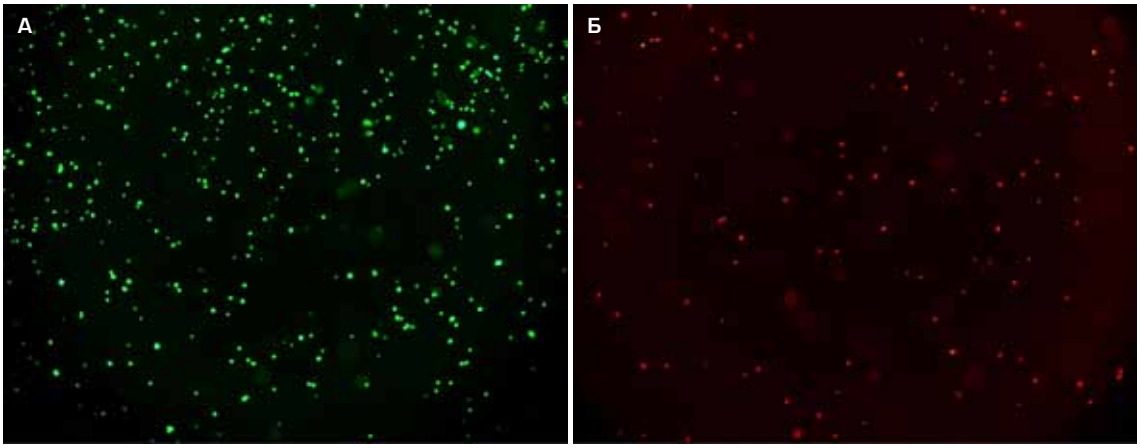

Рис. 4. Культура СКР после 4 ч. инкубации с вискоэластическим препаратом Провиск, окраска ФДА и PI: А — флуоресценция в зеленой области, визуализация живых клеток; Б — флуоресценция в красной области, визуализация некротических клеток. Флуоресцентная микроскопия, ув. ×40

Три морфотипа эпителиоподобных клеток в культурах на ранних пассажах имели сходство с морфотипами, описанными другими исследователями, и по классификации Баррандона и Грина их относят к голо-, меро- и параклонам (эпителиальные стволовые и прогениторные клетки) [23]. Клеткам голоклона присущи все отличительные признаки стволовых клеток, включая морфологию, способность к самообновлению и высокий пролиферативный потенциал.

Анализ фенотипа культивируемых клеток, полученных эксплантным методом, после окраски антителами, используемыми для их идентификации [4, 6, 8, 24], показал, что популяция клеток, судя по содержанию K19$^+$, p63$^+$ и нестина$^+$, представлена эпителиальными стволовыми и прогениторными клетками (рис. 3). Было установлено, что большинство клеток в культуре содержат белок K19 (95±3,2%), входящий в состав промежуточных филаментов цитоскелета и ответственных за структурную целостность эпителиальных клеток. Количество клеток с нестином варьировало от 1,5 до 3,2%. Белок p63 определялся только в 6 из 8 полученных культур СКР и его количество в клетках варьировало от 1,5 до 4,5%. Белок p63 необходим для поддержания клеток в состоянии «стволовости», является регуляторным, он запускает в клетках экспрессию определенных генов (*ABCG2, SOX2* и др.) [7, 8]. Из литературных данных известно, что клетки, в которых присутствует белок p63, оказались эффективными для восстановлении зрения при клеточной терапии роговицы: если в трансплантате было более 3% клеток, содержащих белок p63, то 78% трансплантаций приводили к восстановлению зрения, а когда менее 3%, то успешными были только около 11% трансплантаций [12, 13, 17].

Исследование офтальмологических препаратов на биосовместимость с культивированными СКР

Для сохранения жизнеспособности, оптимизации процесса встраивания и функционирования клеток в ткани в области повреждения при трансплантации клеток используют носители (матрицы), которые должны быть биосовместимы с ними. При исследовании на биосовместимость с СКР ряда коммерческих препаратов, применяемых в офтальмологии, было показано, что они сильно различаются по этому показателю. Препараты Корнерегель и Видисик обладали низкой биосовместимостью: после совместной инкубации в течение 1 ч. этих препаратов с СКР было зарегистрировано появление значительного количества клеток (30–40%), проницаемых для PI, что свидетельствует о развитии их некротической гибели. После 4 ч. инкубации количество некротических клеток составило 80–100%. За этот же период инкубации количество некротических клеток в контроле выросло с 4,1±0,5% до 9,0±0,6. Препараты Офтагель и Вискот обладали лучшей биосовместимостью с СКР: количество некротических клеток после 4 ч. инкубации равнялось 25–35%. Наилучшую биосовместимость среди исследованных препаратов проявил Провиск: после 4 ч. инкубации СКР с данным препаратом количество некротических клеток составило 8,5±0,6% (рис. 4). Следует отметить, что и после 20 ч. инкубации СКР с препаратом Провиск регистрировались жизнеспособные клетки.

Заключение

В результате сравнительного анализа двух способов получения первичных монослойных культур СКР (суспензионного и эксплантного), было установлено, что эксплантный метод является более эффективным

по сравнению с суспензионным, поскольку позволяет в более короткие сроки нарастить значительное количество клеток с эпителиоподобной морфологией, что совпадает с литературными данными [25, 26]. Фрагменты биоптата лимба хорошо адгезировали к поверхности культурального флакона, обработанного коллагеном 1 типа, клетки, которые по морфологии и иммунофенотипу можно отнести к эпителиальным СКР, мигрировали из эксплантa, активно пролиферировали и формировали монослой.

Однако в ряде работ описаны положительные результаты получения первичной культуры эпителиальных СКР с использованием суспензионного метода [5, 6, 16, 27], что противоречит нашим данным. Вероятно, это можно объяснить тем, что количество клеток, оставшихся после ферментативной обработки биоптатов малых размеров (1×2 мм и менее), оказалось недостаточным для формирования монослоя.

Подобранный нами состав ростовой среды: питательная среда DMEM/F12 (1:1), содержащая 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 нг/мл ЭФР, ITS, 0,1 мкг/мл форсколина, обеспечивал жизнеспособность эпителиальных СКР, их пролиферацию и формирование монослоя в культуре, полученной эксплантным способом.

С помощью представленной нами технологии выделения и культивирования СКР из биоптата лимба роговицы пациента можно надежно обеспечить избирательный рост эпителиальных СКР и накопление необходимой клеточной биомассы в течение 3–4 недель (1 и 2 пассажей) — 4,0±1,2 млн СКР из одного биоптата (1×2 мм), что позволяет приготовить аутогенный БМКП для лечения повреждения роговицы.

Результаты фенотипирования культивированных клеток по маркерам K19, p63, нестин выявили преимущественное содержание в культурах эпителиальных СКР (около 95% клеток синтезировали белок K19). Большой разброс или отсутствие количественных данных по таким маркерам, как нестин и регуляторный белок p63 (маркеры стволовых клеток), вероятно, связаны у некоторых пациентов с разной степенью лимбальной недостаточности роговицы глаза. В связи с этим, по-видимому, количественное содержание данных маркеров может быть использовано в качестве прогностического критерия для оценки эффективности лечения пациента с применением конкретного клеточного материала.

Сравнительный анализ ряда офтальмологических препаратов на биосовместимость с СКР обнаружил, что коммерческий препарат Провиск является лучшим по этому показателю. Данный препарат может быть рекомендован к использованию в качестве носителя для приготовления биокомпозита и его перилимбальной трансплантации при воспалительно-дистрофических и язвенных поражениях роговицы глаза.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Scheffer C.G., Tseng M.D., Hua He. et al. Niche regulation of limbal epithelial stem cells: relationship between inflammation and regeneration. Ocul. Surf. 2016; 14(2): 100–12.
2. Ahmad S. Concise review: limbal stem cell deficiency, dysfunction and distress. Stem Cells Transl. Med. 2012; 1(2): 110–5.
3. Haagdorens M., Van Acker S.I., Van Gerwen V. et al. Limbal stem cell deficiency: current treatment options and emerging therapies. Stem Cells Int. 2016; 2016: 9798374.
4. Branch M.J., Hashmani K., Dhillon P. et al. Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012; 53(9): 5109–16.
5. Ghoubay-Benallaoua D., de Sousa C., Martos R. et al. Easy xeno-free and feeder-free method for isolating and growing limbal stromal and epithelial stem cells of the human cornea. PloS One 2017; 12(11): e0188398.
6. Truong T.T., Huynh K., Nakatsu M.N. et al. SSEA4 is a potential negative marker for the enrichment of human corneal epithelial stem/progenitor cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011; 52: 6315–20.
7. Ksander B.R., Kolovou P.E., Wilson B.J. et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. Nature 2014; 511(7509): 353–7.
8. Szabó D.J., Noer A., Nagymihály R. et al. Long-term cultures of human cornea limbal explants form 3D structures ex vivo — implications for tissue engineering and clinical applications. PLoS One 2015; 10: e0143053.
9. Vazirani J., Ali M.H., Sharma N. et al. Autologous simple limbal epithelial transplantation for unilateral limbal stem cell deficiency: multicentre results. Br. J. Ophthalmol. 2016; 100(10): 1416–20.
10. Понятовская А.П., Коротченко С.А., Давыденко Д.В. и др. Трансплантат лимбальных эпителиальных стволовых клеток на биорезорбируемом носителе. Современные технологии в медицине 2017; 9(4): 44–50. (Ponyatovskaya A.P., Korotchenko S.A., Davydenko D.V. et al. Transplant of limbal epithelial stem cells on bioresorbable scaffold. The modern technologies in medicine 2017; 9(4): 44–50).
11. Oie Y., Nishida K. Regenerative medicine for the cornea. Biomed. Res. Int. 2013; 2013: 428247.
12. Dziasko M.A., Daniels J.T. Anatomical features and cell-cell interactions in the human limbal epithelial stem cell niche. Ocul. Surf. 2016; 14: 322–30.
13. Pellegrini G., Traverso C.E., Franzi A.T. et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. Lancet 1997; 349: 990–3.
14. Xie H.T., Chen S.Y., Li G.G. et al. Isolation and expansion of human limbal stromal niche cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012; 53: 279–86.
15. Kethiri A.R., Basu S., Shukla S. et al. Optimizing the role of limbal explant size and source in determining the outcomes of limbal transplantation: An *in vitro* study. PLoS One 2017; 12: e0185623.
16. Deshpande P., Notara M., Bullet N. et al. Development of a surface-modified contact lens for the transfer of cultured limbal epithelial cells to the cornea for ocular surface diseases. Tissue Eng. Part A 2009; 15(10): 2889–902.
17. Pellegrini G., Rama P., Di Rocco A. et al. Concise review: hurdles in a successful example of limbal stem cell-based regenerative medicine. Stem Cells 2014; 32(1): 26–34.
18. Shahdadfar A., Haug K., Pathak M. et al. *Ex vivo* expanded autologous limbal epithelial cells on amniotic membrane using a culture medium with human serum as single supplement. Exp. Eye Res. 2012; 97(1): 1–9.
19. Freshney R. Ian. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 7th ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2015.
20. Laurenza A., Sutkowski E.M., Seamon K.B. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action. Trends Pharmacol. Sci. 1989; 10(11): 442–7.
21. Menzel-Severing J., Kruse F.E., Scolotzer-Scherardt U. Stem cell-based therapy for corneal epithelial reconstruction: present and future. Can. J. Ophthalmol. 2013; 48(1): 13–21.
22. Utheim T.P. Limbal epithelial cell therapy: past, present and future. In: Wright B., Connon C.J., editors. Corneal Regenerative Medicine. Methods Mol. Biol. 2013; 1014: 3–43.
23. Barrandon Y., Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. PNAS USA 1987; 84(8): 2302–6.
24. Ordonez P., Di Girolamo N. Limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment. Stem Cells 2012; 30(2): 100–7.
25. Stasi K., Goings D., Huang J. et al. Optimal isolation and xeno-free culture conditions for limbal stem cell function. Invest. Ophthamol. Vis. Sci. 2014; 55: 375–86.
26. Wright B., Connon C.J. Corneal Regenerative Medicine. Methods and Protocols. New York: Springer; 2013.
27. Koizumi N., Cooper L., Fullwood N.J. et al. An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell suspension culture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002; 43: 2114–21.

Поступила: 25.03.2019