

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc259496>

Культивирование лимбальных стволовых клеток на биополимерном носителе (предварительное сообщение)

Я. Юй¹, А.Ю. Андреев^{1,2,3}, О.С. Роговая⁴, А.М. Суббот², Е.А. Воротеяк³, Е.О. Осидак⁴, Р.Р. Ибрагимова¹

¹ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация;

² Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова, Москва, Российская Федерация;

³ ООО «Имтек», Москва, Российская Федерация;

⁴ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Лимбальная недостаточность является трудноизлечимой патологией, при которой консервативные методы не всегда эффективны, а хирургия лимитирована количеством и доступностью тканей. В связи с этим важен поиск альтернативных методов лечения. На сегодняшний день наиболее перспективным подходом является трансплантация тканеинженерных конструкций, состоящих из культивированных лимбальных стволовых клеток (ЛСК) в составе биополимерных носителей.

Цель исследования — получить и охарактеризовать тканеинженерную конструкцию из культивированных ЛСК и коллагеновой мембраны.

Материалы и методы. Последовательная серия экспериментов выполнена на базе НИИ глазных болезней им. М.М. Краснова и Института биологии развития им. Н.К. Кольцова в сотрудничестве с ООО «ИМТЕК». В качестве источника стволовых клеток лимбальной зоны роговицы использованы 2 кролика породы шиншилла (средний возраст — 6 мес, средняя масса тела — 3,5 кг). Стволовые клетки выделены и выращены *in vitro* модифицированным авторами способом. Полученные клетки культивировали в течение 14 дней и пересаживали на коллагеновую мембрану, которую затем исследовали с помощью методов иммуногистохимии.

Результаты. Клетки, выделенные из биоптата, представляли собой смесь клеток фибробластного типа и клеток с характеристиками ЛСК. Они сохраняли высокую выживаемость, пролиферативную активность, фенотип и стволовость на коллагеновом носителе.

Заключение. Полученная тканеинженерная конструкция может быть использована для дальнейшей пересадки на поражённый глаз с лимбальной недостаточностью в условиях эксперимента.

Ключевые слова: коллаген; тканеинженерная конструкция; лимбальная недостаточность; культивирование лимбальных стволовых клеток; лимбальные стволовые клетки.

Для цитирования:

Юй Я., Андреев А.Ю., Роговая О.С., Суббот А.М., Воротеяк Е.А., Осидак Е.О., Ибрагимова Р.Р. Культивирование лимбальных стволовых клеток на биополимерном носителе (предварительное сообщение) // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 1. С. 79–88. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc259496>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc259496>

Cultivation of limbal stem cells on a biopolymer carrier (preliminary study)

Yang Yu¹, Andrey Yu. Andreev^{1, 2, 3}, Olga S. Rogovaya⁴, Anastasiya M. Subbot², Ekaterina A. Vorotelyak³, Egor O. Osidak⁴, Raisa R. Ibragimova¹

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

² M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

³ Imtek Ltd., Moscow, Russian Federation;

⁴ Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Limbal stem cell deficiency is a complicated pathology of ocular surface, which is not always helped by conservative methods of treatment and surgery is limited by available sources of tissue. Consequently, searching for new effective methods of its treatment is now gaining popularity. The most promising approach is transplantation of tissue-engineered constructs consisting of cultured limbal stem cells (LSCs) and variety of biopolymer carriers.

AIM: This study was performed to obtain and characterize a tissue-engineered constructs consisting of cultured LSCs and collagen membrane.

MATERIALS AND METHODS: The study was performed at the Krasnov Research Institute at the Krasnov Research Institute of Eye Diseases and Koltzov Institute of Developmental Biology in cooperation with IMTEK Ltd. with a series of experiments. Two Chinchilla rabbits with an average weight of 3.5 kg and age of 6 months have been involved in this trial. LSCs were isolated and cultured in vitro from the healthy eye of rabbits using a method modified by the authors. The obtained cells were then cultured for 14 days and transplanted to the collagen membrane, which was then examined using immunohistochemical analysis.

RESULTS: The cells isolated from the biopsy were a mixture of fibroblast-type cells and cells with characteristics of LSC. They maintained high survivability, proliferativity, phenotype and stemness on the collagen carrier according to immunofluorescent study.

CONCLUSIONS: Thus, the abstained tissue-engineered constructs could be used for further transplantation to the affected eye with limbal stem cell deficiency under experimental conditions.

Keywords: collagen; tissue-engineered construct; TEC; limbal stem cell deficiency; LSCD; cultivation of limbal stem cells; limbal stem cells.

To cite this article:

Yu Y, Andreev AY, Rogovaya OS, Subbot AM, Vorotelyak EA, Osidak EO, Ibragimova RR. Cultivation of limbal stem cells on a biopolymer carrier (preliminary study). *Genes & cells*. 2023;18(1):79–88. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc259496>

Received: 20.02.2023

Accepted: 24.03.2023

Published: 04.04.2023

ВВЕДЕНИЕ

С развитием методов регенеративной медицины в офтальмологии возрастает терапевтическая перспективность применения как лимбальных стволовых клеток (ЛСК) эпителия, которые находятся на базальном слое в складках палисада Vogt роговичной части лимба и отвечают за регенерацию эпителия роговицы [1], так и мезенхимальных стволовых клеток/клеток ниши лимба [2]. При повреждении ЛСК и/или нарушении их микроокружения (лимбальной ниши) под воздействием химических, механических, аутоиммунных факторов развивается лимбальная недостаточность (ЛН). Данная патология сопровождается развитием неоваскуляризации и потерей прозрачности роговицы, нарушением её эпителиального слоя, патологическим разрастанием конъюнктивы и, как следствие, снижением остроты зрения [3]. Лечение ЛН включает комплекс мероприятий, направленных на регенерацию эпителия и восстановление функции лимбальной ниши. На данный момент существуют как терапевтические, так и хирургические подходы для решения данной проблемы [4–7].

Консервативные методы подразумевают симптоматическое лечение с помощью различных препаратов (слёзозаменители, противовоспалительные), лечебных контактных линз, а также дериватов аутокрови, которые содержат различные факторы роста, стимулирующие эпителизацию роговицы и активирующие провоспалительные цитокины [4]. К недостаткам консервативного лечения следует отнести отсутствие таргетного воздействия на поражённую ткань и возможности обеспечить длительный терапевтический эффект. Кроме этого, необходимость частых инстилляций приводит к снижению качества жизни пациента. В этой связи современный акцент лечения ЛН смещается к хирургическим техникам, включающим лимбальную трансплантацию и трансплантацию культивированных клеток. При этом основополагающим остаётся вопрос «доставки» и прикрепления трансплантируемых клеток к поражённой поверхности.

Одним из безопасных и эффективных вариантов является субконъюнктивальное инъекционное введение мезенхимальных стволовых клеток [8]. Однако такой способ не может обеспечить длительной и локальной экспозиции клеток в месте инъекции, что приводит к их частичной потере. Кроме того, нахождение клеток в неестественном для них микроокружении оказывает влияние на дальнейшую дифференцировку и пролиферативную активность. По этой причине в качестве носителей для трансплантации клеток используют децеллюлированную ткань (амниотическую мембрану), природные биополимеры (коллаген, хитозан, фибрин, кератин, желатин) или трансплантаты синтетического происхождения (контактные линзы, полиэферы и т.д.) [9–14]. Известные недостатки синтетических носителей (полупрозрачность, вариативное качество, риск передачи

гемотрансмиссивных заболеваний и малая доступность) не исключают необходимости поиска и разработки оптимального носителя для трансплантации ЛСК.

Одно из направлений предполагает использование мембраны из нативного и химически не модифицированного коллагена для транспортировки и пересадки ЛСК. Коллаген является основным структурным белком роговицы и склеры, и поэтому мембраны на его основе максимально близки по своему составу и свойствам к роговице и лимбу. Известно, что материалы на основе коллагена обладают высокой биосовместимостью и прозрачностью, на их поверхности клетки легко адгезируют и пролиферируют с образованием монослоя.

Цель исследования — экспериментальная оценка возможности получения тканеинженерной конструкции из лимбальных стволовых клеток и коллагеновой мембраны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было одобрено Локальным этическим Комитетом ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета) на заседании Локального этического Комитета от 09.12.2021 (протокол № 22-21).

В эксперименте использовали кроликов породы шиншилла (средний возраст — 6 мес, средняя масса тела — 3,5 кг. Процедуры соответствовали международным принципам гуманности, изложенным в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС) и в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Все операции на животных проводили в условиях сочетанной анестезии в операционной с соблюдением правил асептики. Предоперационная подготовка включала обработку операционного поля согласно методике Пирогова–Гроссига–Филончикова, установку блефаростата, местную анестезию в виде субконъюнктивальной инъекции 2% раствора лидокаина в дозе 0,5 мл. Кроме того, внутримышечно вводили 0,4 мл Золетила® 50 и 0,7 мл 2% ксилазина.

В качестве носителя для клеток использована коллагеновая мембрана Viscoll («ИМТЕК», Россия) с высокой концентрацией свиного коллагена I типа, безопасность и биосовместимость которой ранее показана в наших работах и имеет сертификацию по протоколу ISO 13485 [15].

Выделение ЛСК из биоптата проводили модифицированным методом, основанным на комбинировании ферментативного метода и метода экспланта [16].

Для получения лимбального биоптата выполняли разрез конъюнктивы вдоль лимба с 8 до 2 ч. Отсепаровывали конъюнктиву и тенноновую оболочку и выполняли гемостаз. Фрагмент ткани вырезали с помощью остроконечного офтальмологического лезвия, отступив 1 мм со стороны роговицы и конъюнктивы. Операцию

заканчивали наложением двух узловых швов и инъекцией 0,3 мл 0,4% дексаметазона.

Удалённую ткань разделяли на кусочки размера-ми 2×4 мм, тщательно промывали раствором Хенкса («ПанЭко», Россия), содержащим антибиотики (гентамицин 0,16 мг/мл и стрептомицин 1 мг/мл) и амфотерицин В (5 мг/мл). Затем биоптат помещали в 2% раствор диспазы (Gibco, США) в DMEM («ПанЭко», Россия) и ферментировали в течение 1 ч при 37 °С. После первого этапа ферментации под бинокулярным микроскопом из биоптата частично отделяли часть склеры пинцетом. Отделённый эпителий с остаточной склерой разрезали на мелкие кусочки размером 1–2 мм и промывали раствором EDTA («ПанЭко», Россия) с последующим вторичным ферментированием раствором 0,25% трипсина в EDTA («ПанЭко», Россия) в течение 20 мин при 37 °С. Трипсин инактивировали средой DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, после чего интенсивно пипетировали фрагменты лимба с последующим центрифугированием при 400 g (об./мин) в течение 6 мин. Супернатант сливали, остаток с нерастворившимися кусочками лимба и отдельными клеточными конгломератами ресуспендировали в питательной среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 mM глутамин (Gibco, США), 10 нг/мл rEGF (Gibco, США), 5 мл готового реагента Insulin-Transferrin-Selenium (Gibco, США), 10 000 ед./мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, США).

Полученную смесь высевали на чашку Петри диаметром 3 см и дополнительно прижимали наиболее крупные фрагменты ко дну покровным стеклом. Клетки культивировали в условиях 5% CO₂ при 37 °С, среду меняли каждые два дня. Через 7 сут культивирования удаляли покровное стекло. После формирования конфлюэнтного монослоя (через 14 сут) клетки пассировали в культуральный флакон размером 25 см² в концентрации 200 тыс. кл./мл среды в объёме 5 мл. Для дальнейших исследований использовали клетки второго пассажа, которые засевали на коллагеновую мембрану диаметром 0,75 см в концентрации 30 тыс. кл./см².

Клетки подсчитывали на автоматическом счётчике клеток TC20 (Bio-Rad, США). На всех этапах культивирования оценивали их состояние с помощью фазово-контрастной микроскопии на микроскопе СКХ31 (Olympus, Япония).

Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием ядерного контрастирующего вещества Hoechst 33342 (Invitrogen, США) и витального красителя Calcein AM (ab14120; Abcam, США).

Фенотип культивируемых клеток и их уровень пролиферативной активности определяли с помощью иммунофлуоресцентного анализа.

Маркёром ЛСК считали белок P63 [17], использовали антитела (ab735; Abcam, США) в разведении 1:100.

Маркёром зрелых кератоцитов считали цитокератин 3-го и 12-го типов (K3/12), использовали антитела (orb4935; Biorbyt, Великобритания) в разведении 1:250 [18]. Для определения клеток мезенхимального происхождения (фибробластов) использовали антитела Vimentin (ab24525; Abcam, США) в разведении 1:750. Для определения пролиферативной активности проводили окрашивание на Ki-67 (антитела ab16667; Abcam, США) в разведении 1:200.

Иммунофлуоресцентное исследование выполняли следующим образом. Клетки второго пассажа рассеивали в концентрации 4 тыс. кл./мл в 96-луночные планшеты и на коллагеновую мембрану, далее их культивировали в течение 3 дней, затем фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 20 мин, после чего 3 раза промывали фосфатно-солевым буферным раствором (phosphate buffered saline, PBS) и инкубировали в блокирующем растворе (2% эмбриональная телячья сыворотка + 0,5% Triton X-100 + 0,1% NaN₃ на PBS). Раствор первичных антител на клетки наносили в блокирующем растворе. Инкубацию проводили в течение 24 ч при 4 °С. После этого раствор выливали одним движением и промывали материал 3 раза PBS. После промывки материал инкубировали в растворе вторых антител Alexa Fluor Plus 488 (donkey-anti-rabbit, 1:1000, Invitrogen, США; A32790), или Alexa Fluor 488 (goat-anti-chicken, 1:1000, Invitrogen, США; A11093), или Alexa Fluor Plus 555 (donkey-anti-mouse, 1:1000, Invitrogen, США; A32773) в PBS в течение 40 мин в темноте при комнатной температуре. Для окраски ядер использовали краситель 40011 DAPI (Biotium, США) в разведении 1:2000 в течение 10 мин.

Изображения получены с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа IX3-SSU (Olympus, Япония) с встроенной цифровой камерой DP74.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После выделения клеток из лимбального биоптата небольшого размера по модифицированному протоколу уже к 3-м суткам одиночные клетки адгезировали ко дну чашки и активно пролиферировали (рис. 1, *a*). Через 7 сут наблюдали колонии клеток эпителиального типа, заполняющие поверхность приблизительно до 40% конфлюэнтности (рис. 1, *b*). Получившиеся клетки обладают полиморфной формой. Обнаружены круглые, вытянутые веретенообразные, отростчатые клетки и множественные межклеточные соединения. На 10-е сутки культивирования полученные клетки образовывали неплотный монослой со смесью фибробластоподобных и эпителиальных клеток (рис. 1, *c*), а к 14-м суткам — плотный субконфлюэнтный слой (рис. 1, *d*), после чего их пересаживали в культуральный флакон размером 25 см².

После посева на мембрану клетки быстро адгезировали к её поверхности (в срок до 12 ч). В дальнейшем наблюдали за ростом клеток на мембране. В течение

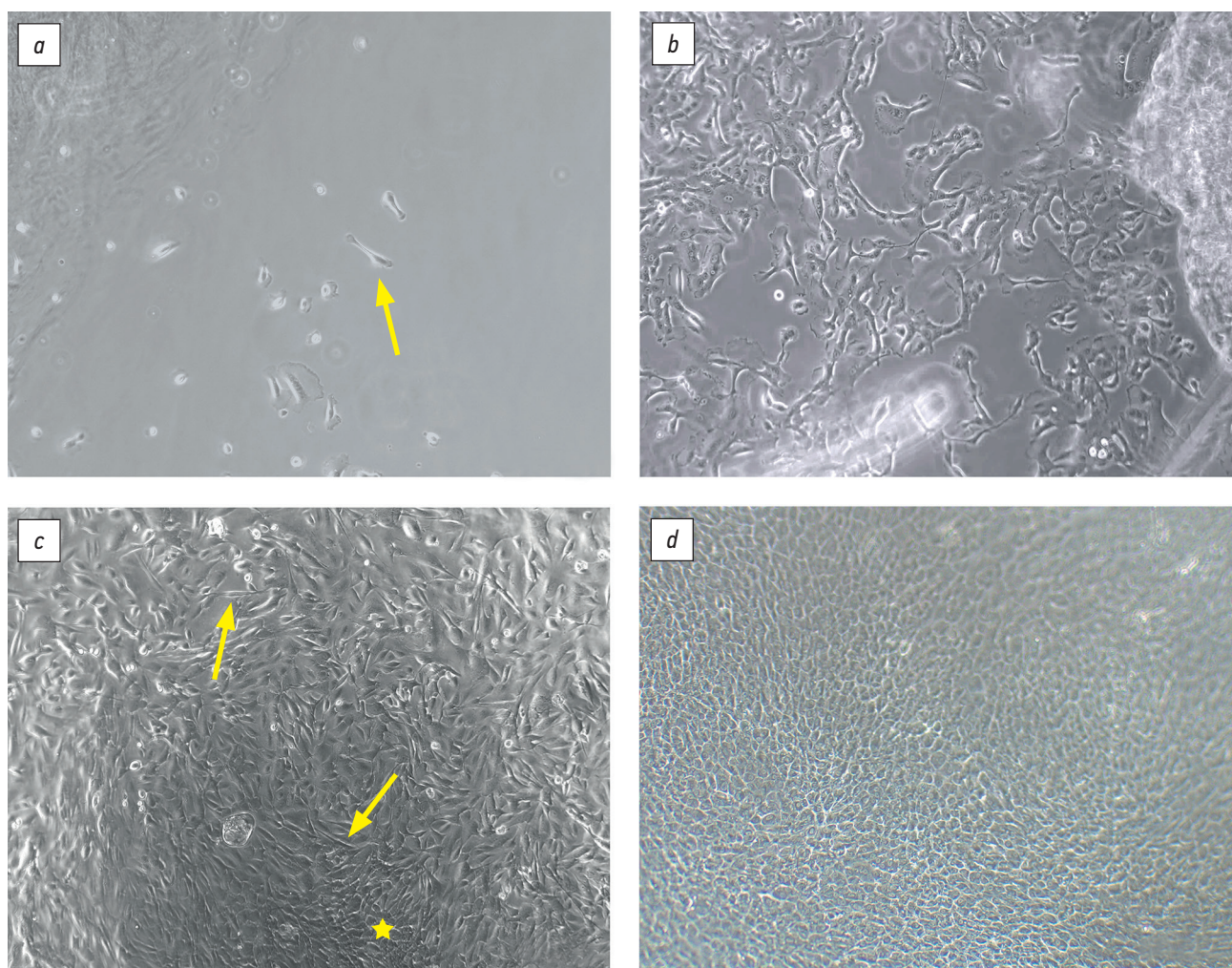


Рис. 1. Первичные культуры лимбальных стволовых клеток (фазово-контрастная микроскопия): *a* — единичные клетки на дне чашки Петри через 3 сут после посева (*стрелка*); *b* — колонии клеток с полиморфной формой через 7 сут; *c* — неплотный монослой со смесью клеток эпителиального (*звёздочка*) и фибробластоподобного типа (*стрелки*) через 10 сут культивирования; *d* — плотный субконфлюентный слой через 14 сут культивирования. Преобладали полигональные формы клеток. Бар — 200 мкм.

Fig. 1. Primary cultures of limbal stem cells (phase-contrast microscopy): *a* — at the bottom of a Petri dish single cells (*arrow*) can be seen three days after inoculation; *b* — colonies of cells with polymorphic shape were formed seven days after inoculation; *c* — a loose monolayer with a mixture of epithelial (*star*) and fibroblast-like cells (*arrows*) was formed ten days after inoculation; *d* — a dense subconfluent layer has been formed in 14 days. Cells were dominated with polygonal forms. Scale bar — 200 μ m.

5–7 сут клетки образовывали на её поверхности кон-
флюентный слой, из чего можно заключить, что на этом
этапе мембраны могут быть трансплантированы живот-
ным. По результатам витального окрашивания Calcein
AM установлено, что выживаемость клеток на мембране
высокая (рис. 2).

Иммунофлуоресцентное окрашивание показало,
что в культуре наблюдалась высокая концентрация про-
лиферирующих клеток, положительно окрашивающихся
на белок Ki-67 (рис. 3, *a*).

При оценке фенотипа полученных клеточных куль-
тур выявлено, что большинство клеток окрашивалось

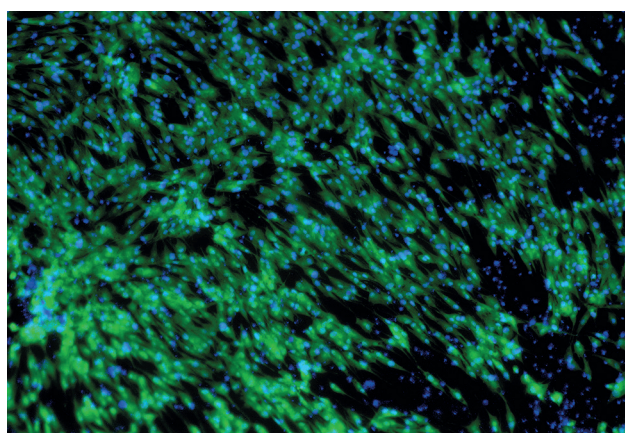


Рис. 2. Культура лимбальных стволовых клеток 2-го пассажа на 14-е сутки культивирования на коллагеновой мембране (флюо-
ресцентная микроскопия). Живые клетки окрашены Calcein AM (*зелёный цвет*), ядра — Hoechst (*синий цвет*). Бар — 200 мкм.

Fig. 2. Culture of limbal stem cells of the second passage in 14 days after inoculation on the collagen membrane (fluorescent micros-
copy). Vital cells were stained by Calcein AM (*green*), nuclei were stained by Hoechst (*blue*). Scale bar — 200 μ m.

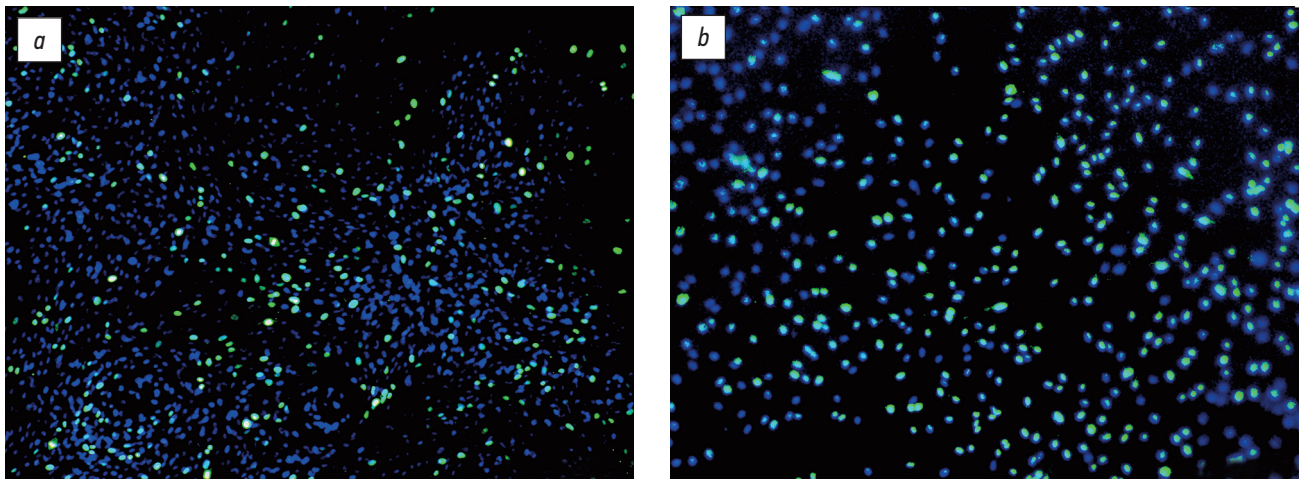


Рис. 3. Культура лимбальных стволовых клеток 2-го пассажа на 14-е сутки культивирования на коллагеновой мембране (флуоресцентная микроскопия). Экспрессия Ki-67 (зелёный цвет), ядра окрашены DAPI (синий цвет): *a* — без мембраны (на пластике); *b* — на коллагеновой мембране. Бар — 200 мкм.

Fig. 3. Culture of limbal stem cells of the second passage in 14 days after inoculation on the collagen membrane (fluorescent microscopy). Ki-67 expression (green), nuclei were stained by DAPI (blue): *a* — without membrane (on plate); *b* — on collagen membrane. Scale bar — 200 μ m.

на K3/12 или Vimentin (рис. 4, *b, c*). Однако около 20% клеток были положительными по маркеру P63 и формировали характерные круглые колонии (рис. 4, *a*), что свидетельствовало о наличии в клетках, полученных из биоптата, популяции ЛСК.

Иммунофлуоресцентный фенотип клеток также оставался сохраненным при культивировании на коллагеновой мембране (рис. 4, *d-f*). Кроме того, выявлена

относительно высокая пролиферативность культивированных клеток (рис. 3, *b*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Лимбальная недостаточность — сложноизлечимая патология, которая приводит к прогрессирующему ухудшению зрения на фоне помутнения роговицы. Ситуация

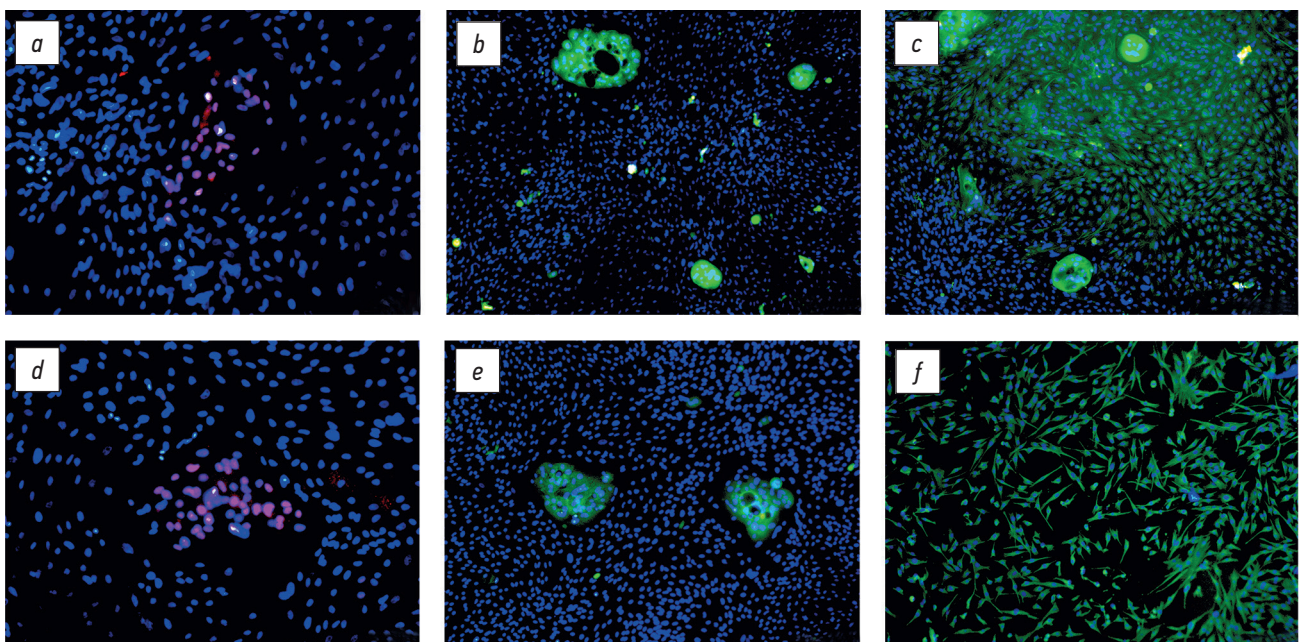


Рис. 4. Культура лимбальных стволовых клеток 2-го пассажа на 14-е сутки культивирования (флуоресцентная микроскопия): *a, d* — экспрессия P63 (розовый цвет); *b, e* — экспрессия цитокератина 3/12 (зелёный цвет); *c, f* — экспрессия Vimentin (зелёный цвет). Ядра окрашены DAPI (синее окрашивание). *a-c* — без мембраны (на пластике); *d-f* — на коллагеновой мембране. Бар: *a, d* — 100 мкм, остальные — 200 мкм.

Fig. 4. Culture of limbal stem cells of the second passage in 14 days after inoculation (fluorescent microscopy): *a, d* — expression of P63 (pink); *b, e* — expression of cytokeratin 3/12 (green); *c, f* — expression of Vimentin (green). Nuclei were stained th DAPI (blue). *a-c* — without membrane (on plate); *d-f* — on collagen membrane. Scale bar: *a, d* — 100 μ m, the others — 200 μ m.

осложняется и тем, что существующие методы хирургического лечения, связанные с трансплантацией донорской роговицы, не могут обеспечить её прозрачного приживления на длительное время. Это обуславливает проведение дополнительных манипуляций по реконструкции лимбальной зоны. Однако ограниченное количество донорского материала и иммунологические реакции тканевой совместимости позволяют решать данную проблему лишь частично.

На фоне вышесказанного культивация клеток лимбальной зоны с последующей их трансплантацией является перспективным направлением, в котором можно выделить ряд сложных задач, таких как сохранение фенотипа культивируемых клеток и разработка носителя для их трансплантации в специфический участок глаза.

В качестве носителей применяются как синтетические, так и природные полимеры. В 2019 году В.В. Карпович и соавт. [10] провели сравнительный анализ свойств синтетических полиэфирных матриц, изготовленных из полилактид-гликолида, полилактид-капролактона и поли-ε-капролактона. Авторы выяснили, что полилактид-капролактон имеет более высокие показатели прозрачности, прочности, биodeградации, близкие по свойствам к амниотической мембране.

В исследовании [12] авторы использовали полимерные комплексы из полиакриловой кислоты и полиэтиленгликоля для имплантации в строму роговицы. Однако у экспериментального кролика появились побочные эффекты в течение 3 мес после имплантации: воспалительная реакция, язва и диффузное помутнение роговицы.

Стоит отметить, что природные материалы обладают большими преимуществами над синтетическими, поскольку обладают высокой биосовместимостью. Однако они сложны в производстве и имеют слабые биомеханические свойства. Коллаген является структурным белком фиброзной оболочки глазного яблока и основным компонентом внеклеточного матрикса, следовательно, он структурированно максимально близок по строению к роговице и лимбу. Это послужило основной причиной выбора данного носителя в нашей работе.

К тому же авторы работы [12] показали, что использование ЛСК в составе материала на основе коллагена обеспечивает возможность создания депо для восстановления эпителия роговицы. В своём исследовании они использовали желатин, изготовленный из коллагена I типа с низкой концентрацией (2 мг/мл), который быстро биodeградирует и не способен длительно поддерживать оптимальную среду для культивированных ЛСК. Кроме того, отсутствовали данные об оценке фенотипических и пролиферативных характеристик клеток после культивирования в составе данного носителя. Поэтому в настоящей работе мы постарались устранить эти недостатки. В проведённом исследовании предпринята попытка применения нативного коллагена I типа, не подвергавшегося химической модификации в качестве

основного матрикса для переноса клеток в лимбальную зону роговицы, что позволяет обеспечить максимальную биосовместимость. Для решения вопроса быстрой биodeградации использована высокая концентрация коллагена (10 мг/мл). J.J. Chae и коллеги [13] применяли коллагеновую мембрану Vitrigel с низкой концентрацией коллагена I типа (0,5%) в качестве носителя для культивированных ЛСК при лечении предварительно созданной тотальной ЛН химическим ожогом. И, несмотря на хорошие результаты, отмечали быструю резорбцию материала и трудности с проведением хирургических манипуляций.

Важным моментом в нашей работе является технологическая возможность получения достаточного количества клеток для дальнейшей культивации и пересадки из небольшого биоптата (размером 2 мм). Такой объём позволит не вызывать ятрогенную ЛН на здоровом глазу и делает методику приближенной к реальному применению в офтальмологии. Это коррелирует с данными зарубежной и российской литературы [19].

Полученные тканеинженерные конструкции также зависят от источника биоптата, методов выделения клеток и условий культивирования. В литературе описаны разные методы выделения ЛСК из биоптата, включая ферментативный и метод эксплантов [20]. В качестве ферментов применяют диспазу и коллагеназу. Нами использован модифицированный ферментативный метод в сочетании с методом эксплантов для обеспечения более быстрого получения ЛСК и клеток ниши лимба, что потенциально может влиять на эффективность лечения, позволяя проводить хирургическое вмешательство в короткие сроки.

Для сохранения более высокой пролиферативной активности и стволовости культивированных клеток, а также для обеспечения возможности трансплантации нами использованы клетки первых пассажей. В отличие от работы А.В. Безушко и соавт. [12], полученные клетки не замораживали, что позволило сохранить основные иммуногистохимические характеристики ЛСК при культивировании на коллагеновой мембране Viscoll.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный алгоритм выделения и культивирования клеток, выделенных из зоны лимба, обеспечивает получение достаточного для формирования тканеинженерной конструкции количества клеток, имеющих в своём составе популяцию лимбальных стволовых клеток. Высокая пролиферативная активность и фенотип сохраняются после культивирования на коллагеновой мембране. Сформированная тканеинженерная конструкция, состоящая из культуры клеток лимба и коллагеновой мембраны Viscoll, может быть применена для дальнейшего экспериментального изучения с целью лечения лимбальной недостаточности.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Научное исследование проведено в рамках раздела Государственного здания Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН № 0088-2021-0016.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов: Я. Юй — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, сбор и обработка материала, подготовка и написание текста, редактирование статьи; А.Ю. Андреев — концепция и дизайн исследования, редактирование статьи; О.С. Роговая — сбор и обработка материала, редактирование статьи; А.М. Суббот, Е.А. Воротеляк — редактирование статьи; Е.О. Осидак — концепция и дизайн исследования; Р.Р. Ибрагимова — сбор и обработка материала. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Благодарности. Авторы выражают свою признательность компании «Имтек» за предоставленные коллагеновые мембраны для проведения эксперимента.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This study was performed within the section of the State Building of the IDB RAS № 0088-2021-0016.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution: Yang Yu — performed experiments, analyzed data, wrote and edited the manuscript; A.Yu. Andreev — designed the study, edited the manuscript; O.S. Rogovaya — performed experiments, edited the manuscript; A.M. Subbot, E.A. Vorotelyak — edited the manuscript; E.O. Osidak — concept and designed the study; R.R. Ibragimova — performed experiments. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Acknowledgments. We thank the "Imtek" company for support collagen membrane.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schermer A., Galvin S., Sun T.T. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells // *J Cell Biol.* 1986. Vol. 103, N 1. P. 49–62. doi: 10.1083/jcb.103.1.49
- Li G., Zhang Y., Cai S., et al. Human limbal niche cells are a powerful regenerative source for the prevention of limbal stem cell deficiency in a rabbit model // *Sci Rep.* 2018. Vol. 8, N 1. P. 6566. doi: 10.1038/s41598-018-24862-6
- Deng S.X., Borderie V., Chan C.C., et al. Global consensus on definition, classification, diagnosis, and staging of limbal stem cell deficiency // *Cornea.* 2019. Vol. 38, N 3. P. 364–375. doi: 10.1097/ICO.0000000000001820
- Azari A., Rapuano C.J. Autologous serum eye drops for the treatment of ocular surface disease // *Eye Contact Lens.* 2015. Vol. 41, N 3. P. 133–140. doi: 10.1097/ICL.000000000000104
- Lim L., Lim E.W.L. Therapeutic contact lenses in the treatment of corneal and ocular surface diseases — a review // *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* 2020. Vol. 9, N 6. P. 524–532. doi: 10.1097/APO.0000000000000331
- Kim B., Bakhtiar P. Medical management of limbal stem cell deficiency with anti-inflammatory therapy and tear film optimization // *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013. Vol. 54. P. 545.
- Ramachandran C., Basu S., Sangwan V.S., et al. Concise review: the coming of age of stem cell treatment for corneal surface damage // *Stem Cells Transl Med.* 2014. Vol. 3, N 10. P. 1160–1168. doi: 10.5966/sctm.2014-0064
- Galindo S., de la Mata A., López-Paniagua M., et al. Subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for corneal failure due to limbal stem cell deficiency: state of the art // *Stem Cell Res Ther.* 2021. Vol. 12, N 1. P. 60. doi: 10.1186/s13287-020-02129-0
- Anderson D.F., Ellies P., Pires R.T., Tseng S.C. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency // *Br J Ophthalmol.* 2001. Vol. 85, N 5. P. 567–575. doi: 10.1136/bjo.85.5.567
- Карпович В.В., Куликов А.Н., Чурашов С.В., и др. Исследование свойств синтетических полимерных матриц, изготовленных для трансплантации культивированных лимбальных стволовых клеток с целью устранения лимбальной недостаточности // *Вестник Российской Военно-медицинской академии.* 2019. № 1. С. 165–170.
- Tan X.W., Hartman L., Tan K.P., et al. In vivo biocompatibility of two PEG/PAA interpenetrating polymer networks as corneal inlays following deep stromal pocket implantation // *J Mater Sci Mater Med.* 2013. Vol. 24, N 4. P. 967–977. doi: 10.1007/s10856-012-4848-3
- Безушко А.В., Дубовиков А.С., Куликов А.Н., и др. Применение коллагенового скаффолда и амниотической мембраны с культивируемыми стволовыми клетками лимба для устранения лимбальной недостаточности: экспериментальное исследование // *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2019. № 2. С. 54–57. doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.2.54-57
- Chae J.J., Ambrose W.M., Espinoza F.A., et al. Regeneration of corneal epithelium utilizing a collagen vitrigel membrane in rabbit models for corneal stromal wound and limbal stem cell deficiency // *Acta Ophthalmol.* 2015. Vol. 93, N 1. P. e57–e66. doi: 10.1111/aos.12503
- Guérin L.P., Larouche D., Morcos M.W., et al. Cultured autologous corneal epithelia for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency: a case series of 15 patients // *Biomedicines.* 2022. Vol. 10, N 8. P. 1958. doi: 10.3390/biomedicines10081958
- Osidak E.O., Andreev A.Y., Avetisov S.E., et al. Corneal stroma regeneration with collagen-based hydrogel as an artificial stroma

equivalent: a comprehensive in vivo study // *Polymers*. 2022. Vol. 14, N 19. P. 4017. doi: 10.3390/polym14194017

16. Юй Я., Роговая О.С., Андреев А.Ю., Ибрагимова Р.Р. Алгоритм выделения лимбальных стволовых клеток из биоптата у экспериментальных животных // Российский общенациональный офтальмологический форум. 2022. № 2. С. 462–465.

17. Di Iorio E., Barbaro V., Ruzza A., et al. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. Vol. 102, N 27. P. 9523–9528. doi: 10.1073/pnas.0503437102

18. Kao W.W. Keratin expression by corneal and limbal stem cells during development // *Exp Eye Res*. 2020. Vol. 200. P. 108206. doi: 10.1016/j.exer.2020.108206

19. Shortt A.J., Secker G.A., Notara M.D., et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results // *Surv Ophthalmol*. 2007. Vol. 52, N 5. P. 483–502. doi: 10.1016/j.survophthal.2007.06.013

20. Zhang X., Sun H., Tang X., et al. Comparison of cell-suspension and explant culture of rabbit limbal epithelial cells // *Exp Eye Res*. 2005. Vol. 80, N 2. P. 227–233. doi: 10.1016/j.exer.2004.09.005

REFERENCES

1. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*. 1986;103(1):49–62. doi: 10.1083/jcb.103.1.49

2. Li G, Zhang Y, Cai S, et al. Human limbal niche cells are a powerful regenerative source for the prevention of limbal stem cell deficiency in a rabbit model. *Sci Rep*. 2018;8(1):6566. doi: 10.1038/s41598-018-24862-6

3. Deng SX, Borderie V, Chan CC, et al. Global consensus on definition, classification, diagnosis, and staging of limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2019;38(3):364–375. doi: 10.1097/ICO.0000000000001820

4. Azari A, Rapuano CJ. Autologous serum eye drops for the treatment of ocular surface disease. *Eye Contact Lens*. 2015;41(3):133–140. doi: 10.1097/ICL.0000000000000104

5. Lim L, Lim EWL. Therapeutic contact lenses in the treatment of corneal and ocular surface diseases — a review. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2020;9(6):524–532. doi: 10.1097/APO.0000000000000331

6. Kim B, Bakhtiari P. Medical management of limbal stem cell deficiency with anti-inflammatory therapy and tear film optimization. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:545.

7. Ramachandran C, Basu S, Sangwan VS, et al. Concise review: the coming of age of stem cell treatment for corneal surface damage. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(10):1160–1168. doi: 10.5966/sctm.2014-0064

8. Galindo S, de la Mata A, López-Paniagua M, et al. Subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for corneal failure due to limbal stem cell deficiency: state of the art. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):60. doi: 10.1186/s13287-020-02129-0

9. Anderson DF, Ellies P, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(5):567–575. doi: 10.1136/bjo.85.5.567

10. Karpovich VV, Kulikov AN, Churashov SV, et al. Research of the properties of synthetic polymer matrices made for transplantation of cultured limbal stem cells to eliminate a limbal deficiency. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2019;1(65):165–170. (In Russ).

11. Tan XW, Hartman L, Tan KP, et al. In vivo biocompatibility of two PEG/PAA interpenetrating polymer networks as corneal inlays

following deep stromal pocket implantation. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(4):967–977. doi: 10.1007/s10856-012-4848-3

12. Bezushko AV, Dubovikov AS, Kulikov AN, et al. The use of collagen scaffold and amniotic membrane with laboratory-reared stem cells to manage limbal deficiency: experimental study. *Pacific Medical Journal*. 2019;(2):54–57. (In Russ). doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.2.54-57

13. Chae JJ, Ambrose WM, Espinoza FA, et al. Regeneration of corneal epithelium utilizing a collagen vitrigel membrane in rabbit models for corneal stromal wound and limbal stem cell deficiency. *Acta Ophthalmol*. 2015;93(1):e57–e66. doi: 10.1111/aos.12503

14. Guérin LP, Larouche D, Morcos MW, et al. Cultured autologous corneal epithelia for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency: a case series of 15 patients. *Biomedicines*. 2022;10(8):1958. doi: 10.3390/biomedicines10081958

15. Osidak EO, Andreev AY, Avetisov SE, et al. Corneal stroma regeneration with collagen-based hydrogel as an artificial stroma equivalent: a comprehensive in vivo study. *Polymers*. 2022;14(19):4017. doi: 10.3390/polym14194017

16. Juj Ja, Rogovaja OS, Andreev AJU, Ibragimova RR. Алгоритм выделения лимбальных стволовых клеток из биоптата у экспериментальных животных. *Rossiiskij obshhenacional'nyj oftal'mologicheskij forum*. 2022;(2):462–465. (In Russ).

17. Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, et al. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9523–9528. doi: 10.1073/pnas.0503437102

18. Kao WW. Keratin expression by corneal and limbal stem cells during development. *Exp Eye Res*. 2020;200:108206. doi: 10.1016/j.exer.2020.108206

19. Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol*. 2007;52(5):483–502. doi: 10.1016/j.survophthal.2007.06.013

20. Zhang X, Sun H, Tang X, et al. Comparison of cell-suspension and explant culture of rabbit limbal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2005;80(2):227–233. doi: 10.1016/j.exer.2004.09.005

ОБ АВТОРАХ

* **Юй Ян**, аспирант;
адрес: Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9920-3611>;
eLibrary SPIN: 8114-2544;
e-mail: yuyang123@mail.ru

Андреев Андрей Юрьевич, канд. мед. наук;
ORCID: <https://orcid.org/000-0002-0267-9040>;
eLibrary SPIN: 6410-7993;
e-mail: docandreev@gmail.com

Роговая Ольга Сергеевна, канд. биол. наук;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4251-9372>;
eLibrary SPIN: 1441-8532;
e-mail: rogovaya26f@gmail.com

Суббот Анастасия Михайловна, канд. мед. наук,
старший научный сотрудник;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8258-6011>;
eLibrary SPIN: 3898-2570;
e-mail: kletkagb@gmail.com

Воротеляк Екатерина Андреевна, д-р биол. наук,
член-корреспондент Российской академии наук;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5405-0212>;
eLibrary SPIN: 2310-9118;
e-mail: vorotelyak@idbras.ru

Осидак Егор Олегович, канд. биол. наук;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2549-4011>;
eLibrary SPIN: 9995-3951;
e-mail: eosidak@gmail.com

Ибрагимова Раиса Рафиговна, аспирант;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8976-3546>;
eLibrary SPIN: 7893-4570;
e-mail: rafael669@yandex.ru

* **Автор, ответственный за переписку / Corresponding author**

AUTHORS' INFO

* **Yang Yu**, PhD student;
address: 8/2 Trubetskaya street, 119992 Moscow, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9920-3611>;
eLibrary SPIN: 8114-2544;
e-mail: yuyang123@mail.ru

Andrey Yu. Andreev, MD, Cand. Sci. (Med);
ORCID: <https://orcid.org/000-0002-0267-9040>;
eLibrary SPIN: 6410-7993;
e-mail: docandreev@gmail.com

Olga S. Rogovaya, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4251-9372>;
eLibrary SPIN: 1441-8532;
e-mail: rogovaya26f@gmail.com

Anastasiya M. Subbot, MD, Cand. Sci. (Med.),
Senior Research Fssociate;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8258-6011>;
eLibrary SPIN: 3898-2570;
e-mail: kletkagb@gmail.com

Ekaterina A. Vorotelyak, Dr. Sci. (Biol.),
corresponding member of the Russian Academy of Sciences;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5405-0212>;
eLibrary SPIN: 2310-9118;
e-mail: vorotelyak@idbras.ru

Egor O. Osidak, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2549-4011>;
eLibrary SPIN: 9995-3951;
e-mail: eosidak@gmail.com

Raisa R. Ibragimova, PhD student;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8976-3546>;
eLibrary SPIN: 7893-4570;
e-mail: rafael669@yandex.ru