

УДК 617.731

## Предоперационная подготовка клеточных трансплантатов лимба для лечения оптических нейропатий (экспериментальное исследование)

С.А. Борзенко<sup>1, 2</sup>, М.Х. Хубецова<sup>1</sup>, И.Н. Сабурин<sup>3, 4</sup>, Н.А. Гаврилова<sup>2</sup>, Ю.А. Комах<sup>1</sup>, Х.Д. Тонаева<sup>1</sup>, Д.С. Островский<sup>1</sup>, Н.И. Ланевская<sup>1, 2</sup>, Л.Н. Скуратовская<sup>3</sup>, В.С. Репин<sup>1, 3, 4</sup>

<sup>1</sup> ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва;

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва;

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва;

<sup>4</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России

### РЕФЕРАТ

**Цель.** Изучить в эксперименте *in vitro* секрецию фактора роста нервов (ФРН) и нейроростового фактора головного мозга (НФГМ) интактными и индуцированными мультипотентными мезенхимальными стволовыми клетками лимба (ММСК) в трехмерной культуре (3D).

**Материал и методы.** ММСК получали путем культивирования фрагментов лимба, выделенных из трупных донорских глаз человека согласно медицинской технологии Глазного тканевого банка ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Фенотип полученной клеточной культуры изучали с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Стимуляцию секреции нейротрофических факторов проводили по двухэтапной методике с использованием неспецифических факторов активации: EGF, hbFGF, добавка N2, дибутирил цАМФ, NRG1-beta 1, PDGF, 3-изобутил-1-метилксантин. 3D-клеточные сфероиды создавали с использованием агарозных планшетов (3D Petri dishes, Microtissue, США) для трех групп сравнения, где I группа – контрольная, II группа – с индукцией сфероидов на 1 сутки культивирования; III группа – с индукцией сфероидов на 7 сутки культивирования. Концентрацию ФРН и НФГМ в среде культивирования изучали методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Офтальмохирургия. – 2017. – № 2. – С. 28–34.

**Результаты.** Индукция 3D-сфероидов ММСК лимба, проведенная на 1 и 7 сутки инкубирования, 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 3D-клеточных сфероидов.

**Заключение.** Клеточные сфероиды, созданные из 2D-культуры интактных ММСК лимба методом трехмерного культивирования, способны в достаточных терапевтических концентрациях спонтанно синтезировать ФРН и НФГМ, являются наиболее оптимальной конструкцией для трансплантации в экстрабульбарные и интраокулярные тканевые ниши глазного яблока, являются потенциальным источником пролонгированной секреции нейроростовых факторов в клеточной терапии оптических нейропатий.

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

**Авторы не имеют финансовых или интеллектуальных интересов в упомянутых материале и методах.**

### ABSTRACT

#### Preoperative preparation of limbal cell transplants for the treatment of optic neuropathy (experimental study)

S.A. Borzenok<sup>1, 2</sup>, M.K. Khubetsova<sup>1</sup>, I.N. Saburina<sup>3, 4</sup>, N.A. Gavrilova<sup>2</sup>, Y.A. Komakh<sup>1</sup>, K.D. Tonaeva<sup>1</sup>, D.S. Ostrovsky<sup>1</sup>, N.I. Lanevskaya<sup>1, 2</sup>, L.N. Skuratovskaya<sup>3</sup>, V.S. Repin<sup>1, 3, 4</sup>

<sup>1</sup> The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow;

<sup>2</sup> The A.I. Evdokimov Moscow State Medical Dental University;

<sup>3</sup> The Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow;

<sup>4</sup> The Russian Medical Academy of Postgraduate Education

**Purpos.** To study experimentally *in vitro* secretion of the nerve growth factor (NGF) and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) using intact and induced multi-potent mesenchymal limbal stem cells (MSCs) in three-dimensional culture (3D).

**Material and methods.** MSCs were obtained by culturing of limbal fragments, isolated from the cadaveric human donor eyes, according to the medical technology of the S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution. The phenotype of obtained cell culture was studied by the flow cytometry method.

Stimulation of secretion of neurotrophic factors was performed via a two-step technique using non-specific activation factors: EGF, hbFGF, N2 additive, dibutyryl cAMP, NRG1-beta 1, PDGF, 3-isobutyl-1-methylxanthine. The 3D-cell spheroids were generated using agarose plates (3D Petri dishes, Microtissue, USA) for three comparative groups where: Group I – control, Group II – with the induction of spheroids at 1 day of cultivation; Group III – with induction of spheroids at 7 days of cultivation. The concentration of NGF and BDNF in the culture medium was studied using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

**Results.** The induction of the 3D spheroids of limbal MSCs, that carried out on the 1st and 7th days of incubation, contributes to a significant increase in the production of NGF and BDNF, but subsequently a pronounced reduction in the secretion of these factors is observed. The conducting of an induction leads to a change in the morphology

of spheroids: loss of compactness, the emergence of «fringed» (debris). Such changes indicate a non-viability of the obtained 3D-cell spheroids.

**Conclusion.** The cellular spheroids, created from 2D-culture of intact limbal MSCs by the three-dimensional culture method, are capable in sufficient therapeutic concentrations spontaneously to synthesize NGF and BDNF, have the most optimal design for transplantation in extrabulbar and intraocular tissue niches of the eyeball, are a potential source of prolonged secretion of neural basis function in cell treatment of optic neuropathy.

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

**No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.**

The Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.– 2017.– No. 2.– P. 28–34.

В настоящее время в регенеративной медицине широко разрабатываются подходы клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний посредством пролонгированной секреции нейротрофических факторов (НТФ) – семейства крупных полипептидов, регулирующих выживание, развитие и функцию нейронов [2]. В офтальмопатологии к таким нейродегенеративным заболеваниям относятся первичная открытоугольная глаукома, которая характеризуется прогрессирующей оптической нейропатией с патологическим изменением полей зрения вследствие гибели ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) [4]. С эпидемиологической точки зрения первичная глаукома является одной из главных причин слепоты и инвалидности по зрению, и, по данным Quigley H.A. [19], число таких пациентов в мире к 2020 г. достигнет 79,6 млн.

В последнее время появляются единичные публикации, в которых авторы в качестве источников клеточной терапии глаукомной оптиконейропатии изучают возможность использования клеток-предшественников олигодендроцитов, клеток Мюллера, ММСК костного мозга [13]. К настоящему времени доступность жизнеспособного клеточного материала и снятие ряда этических проблем, отсутствие признаков трансформации и образования тератом обуславливают широкие перспективы использования ММСК в клинике для клеточной трансплантации и терапии.

В ряде исследований показана эффективность ММСК в восстановлении и регенерации поврежденной нервной ткани в центральной и периферической нервной системе [11, 23]. В единичных экспериментальных работах показана выраженная нейропротекция ГКС после трансплантации ММСК в полость стекловидного тела глаза крысы с индуцированной офтальмогипертензией и признаками оптиконейропатии [11, 12]. При этом патогенетический механизм действия клеточной терапии остается до конца не установленным, однако предполагается, что лечебный эффект ММСК обусловлен интеграцией донорских клеток в тканевые ниши реципиента, секреторной активностью и иммуномодулирующим действием после их трансплантации [22].

Интеграция ММСК при трансплантации требует строительства крайне сложных аксональных связей в сетчатке и в головном мозге реципиента. В 2005 г. Gneschi M. [10] выдвинул концепцию, согласно которой терапевтический потенциал ММСК в основном связан с секреторными биологически активными факторами. В те же годы в работе Crigler L. и соавт. была показана возможность выделения ММСК нейротрофических факторов [8]. Было установлено, что в норме ГКС получают НТФ посредством ретроградного аксоплазматического транспорта [14]. Однако при глаукоме стойкое повышение ВГД приводит к прогибанию решетчатой мембраны и де-

формации просветов микротубул. В деформируемых канальцах возникают «стригущие» усилия встречных стенок [9], приводящие к компрессии заключенных в суженных канальцах аксонов с последующим нарушением быстрого аксоплазматического тока [16]. Данные изменения запускают механизм патологического апоптоза, обуславливающего прогрессирующее каскада гибели клеток, даже на фоне стабилизированного ВГД [18]. В этой связи трансплантация культивированных ММСК в тканевые ниши сетчатки и других внутриглазных структур при глаукомной оптиконейропатии нам представляется патогенетически некорректной и требует дальнейшего поиска адекватных условий клеточной терапии.

В настоящее время широко изучаются протоколы индукции ММСК, направленные на стимуляцию секреции НТФ. В ряде экспериментальных работ было подтверждено более выраженное нейропротекторное действие на ГКС индуцированных ММСК по сравнению с неиндуцированными [20, 21, 24]. Но эти работы проводились с использованием плоскостных 2D-культур клеток. Известно, что в условиях 2D-культивирования естественные процессы в клеточном микроокружении воспроизводятся не в полной мере, что отрицательно влияет на их функ-

#### Для корреспонденции:

Хубецова Мадина Хетаговна, аспирант  
E-mail: porporina@inbox.ru

Таблица 1

## Основные характеристики трупных донорских глаз человека, использованных в эксперименте

№ глаза донора-трупа по протоколу Глазного банка	Время от момента смерти до энуклеации, в час	Возраст донора, лет	Показатель адрениновой пробы по Борзенку
22299 22300	18,0	29	А
22397 22398	8,3	42	А
22247 22248	14,0	64	А
22373 22374	10,3	65	А

ции [7]. Культивирование ММСК в 2D-культурах может изменять их нормальное физиологическое поведение и приводить к потере пролиферативной и секреторной активности [6, 15]. Наиболее эффективной и максимально приближенной по свойствам и организации к естественной клеточно-тканевой системе может рассматриваться 3D-культура в виде клеточных сфероидов.

В последнее время широко изучаются ММСК лимба, которые относятся к истинным ММСК [17] и могут быть использованы в клинике глазных болезней как альтернатива костномозговому мезенхимальным клеткам [1]. В доступной литературе нам не удалось найти данных об индукции 3D-клеточных культур ММСК лимба, направленной на секрецию наиболее значимых НТФ.

## ЦЕЛЬ

Изучить в эксперименте *in vitro* секрецию фактора роста нервов (ФРН) и нейроростового фактора головного мозга (НФГМ) интактными и индуцированными мультипотентными мезенхимальными стволовыми клетками лимба (ММСК) в трехмерной культуре (3D).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Отбор, выделение и культивирование ММСК лимба

В качестве первичного источника ММСК использовались лимбальные фрагменты глазных яблок доноров-трупов.

Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из трупных донорских глаз человека, про-

водились 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 г., выданной ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Для выделения ММСК было использовано 8 глазных яблок от 4 доноров-трупов (табл. 1).

Глазные яблоки от доноров-трупов отбирались с учетом критериев посмертной жизнеспособности клеток по показателю периода после смерти (до 18 час), возрастному лимиту (не более 65 лет) и адрениновой пробы на клеточную витальность (степени А или В по Борзенку С.А., 2008).

Тканевые фрагменты лимба выделялись по ранее предложенной технике [5]. Для чистоты выделения ММСК лимба механическим путем предварительно удалялся слой переднего эпителия.

Изолированные фрагменты лимба переносились в 25 см<sup>3</sup> культуральные матрасы, инкубирование осуществлялось в среде DMEM/F12 (1:1) (ПанЭко, Россия) с добавлением L-глутамин – 0,58 г/л, NEPES – 10 мМ, пенициллин – 10000 ЕД/мл, стрептомицин – 10000 ЕД/мл, амфотерицин В – 1,25 мг/мл, инсулин – 0,4 мкМ, дексаметазон – 10 нМ и 10 об. % фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) при стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37° С), смена среды проводилась через каждые 3 суток. При достижении монослоем клеток 80-90% конfluэнтности осуществлялось пассирование культуры с использованием растворов версена и 0,25% трипсина-ЭДТА (ПанЭко,

Россия). Подсчет клеток при пассировании культуры производился с использованием камеры Горяева. В экспериментальных сериях использовались культуры ММСК четвертого пассажа, достигшие 80-90% конfluэнтности.

## Проведение проточной цитофлуориметрии

Для определения иммунофенотипа полученной культуры клеток применялся метод проточной цитофлуориметрии 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. Действие фермента инактивировалось добавлением 10 об. % фетальной бычьей сыворотки, подсчитывалось количество клеток и проводилось их центрифугирование (300 г, 5 мин). Полученный осадок ресуспендировался в растворе фосфатно-солевого буфера (pH=7,4) с 1 об. % фетальной бычьей сыворотки и аликвотировался. Каждая пробирка инкубировалась в темноте (при 250 С, 15 мин) с антителами (10 мкл раствора антител на 1 млн. клеток). Полученные результаты анализировались на проточном цитофлуориметре «CytoFLEX» (Beckman Coulter Inc, США).

## Проведение индукции секреции нейротрофических факторов ММСК лимба

Индукция секреции НТФ ММСК лимба осуществлялась по двухэтапной методике с использованием неспецифических факторов ак-

тивации. 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).

### Создание клеточных 3D-сфероидов

Из охарактеризованной 2D-культуры ММСК лимба создавались 3D-сфероиды с использованием неадгезивных 256-луночных агарозных планшетов (3D Petri dishes, Microtissue, США): I группа – контрольная, без индукции; II группа – с индукцией сфероидов на 1 сутки культивирования; III группа – с индукцией сфероидов на 7 сутки культивирования. Посевная концентрация ММСК составляла 256000 кл/мл.

### Световая микроскопия

Полученные 2D- и 3D-культуры ММСК лимба анализировались с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX 41 (Olympus, Япония) в проходящем свете, фазовом контрасте и темном поле.

### Проведение иммуноферментного анализа

Для исследования содержания нейротрофических факторов ФРН и НФГМ методом ИФА супернатанты клеточных культур отбирались в разные сроки культивирования и хранились при t=800 С в соответствии с инструкцией производителя (Almabion). ИФА проводился на микропланшетном фотометре «Anthos» (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия). 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).

Полученная культура клеток лимба экспрессировала характерные для ММСК костного мозга маркеры (CD105, CD90, CD73), практически не экспрессировала маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного ряда CD133, CD 19 (табл. 2).

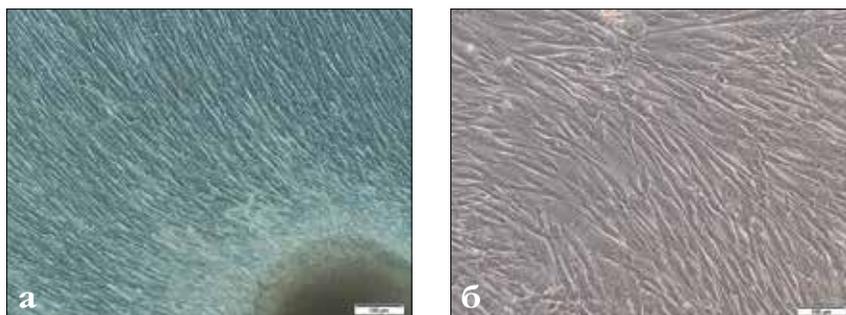


Рис. 1. 2D-культура ММСК аллогенных фрагментов лимба, световая микроскопия, ув. x100: а) 0 пассаж; б) 4 пассаж

Таблица 2

Имунофенотипический анализ экспрессии поверхностных маркеров ММСК лимба в 2D-культуре	
Анализируемые маркеры	Уровень экспрессии, %
CD105 (эндоглин)	99,5
CD90 (Thy-1, гликопротеин суперсемейства иммуноглобулинов)	98,0
CD133 (промиллин-1, антиген гемопоэтических стволовых клеток)	5,2
CD19 (B-лимфоцитарный антиген)	7,7
CD73 (5'-нуклеотидаза)	90,0

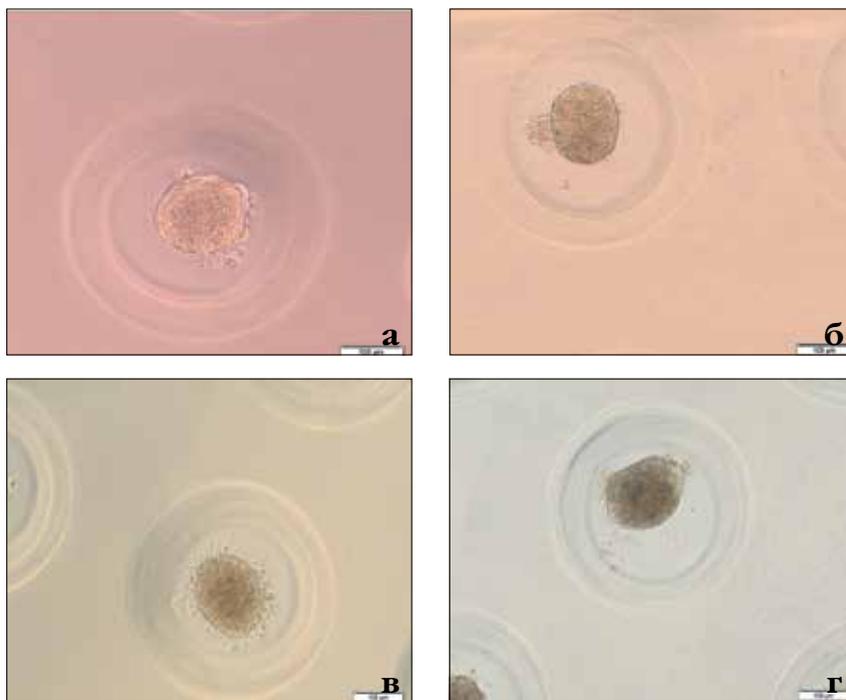


Рис. 2. 3D-культура ММСК, I группа, контроль, световая микроскопия, ув. x100: а) 1 сутки; б) 4 сутки; в) 7 сутки, г) 21 сутки культивирования

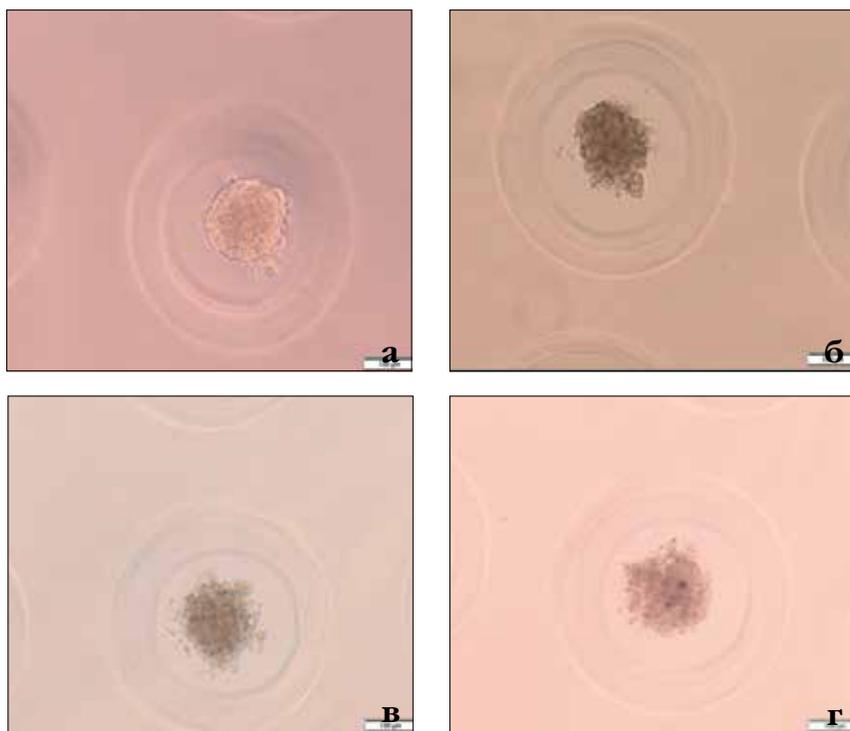


Рис. 3. 3D-культура ММСК, II группа, индукция на 1 сутки культивирования, световая микроскопия, ув. x100: а) 1 сутки; б) 4 сутки; в) 7 сутки, г) 21 сутки

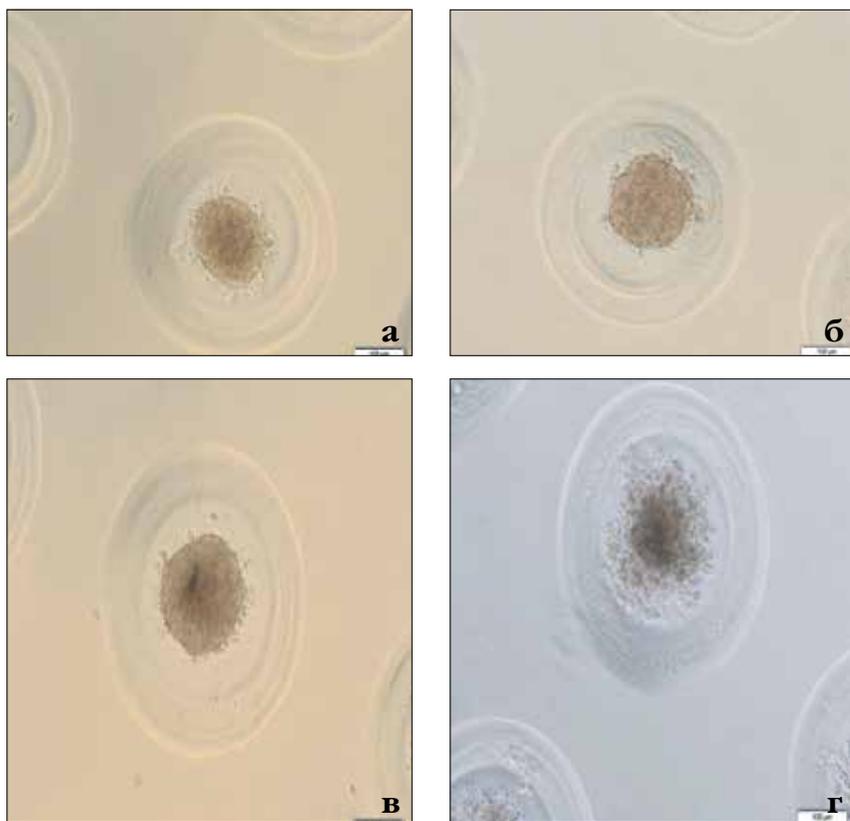


Рис. 4. 3D-культура ММСК, III группа, индукция на 7 сутки культивирования, световая микроскопия, ув. x100: а) 1 сутки; б) 4 сутки; в) 7 сутки, г) 21 сутки

При исследовании динамики сфероидообразования в контрольной группе уже в первые часы инкубирования клетки объединялись в агрегаты (рис. 2а, б), которые к концу 7 суток формировали компактные, плотные сфероиды с гладким поверхностным слоем (рис. 2в).

Во II группе после индукции на 4-е сутки сфероиды приобретали «бугристость» (рис. 3а, б), что было обусловлено стимуляцией пролиферативной активности клеток, формирующих сфероид. Однако в дальнейшем отмечались разрыхление клеточного конгломерата, потеря компактности и появление бахромчатости (рис. 3в), что являлось косвенным свидетельством нежизнеспособности.

В III группе индукция проводилась на 7-е сутки, соответствующие сроку окончания сфероидообразования [3]. При этом индукция вызвала такие же изменения, как и во II группе (рис. 4). Дальнейшая экспозиция клеток в 3D-культуре не приводила к каким-либо морфологическим изменениям сфероидов (рис. 2г, 3г, 4г).

Одним из критериев жизнеспособности сфероидов является их способность к адгезии. В I 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. Образующий клеточный слой являлся неоднородным. Так в центре слоя находился остаток сфероиды, а клетки образуемого периферического монослоя по своей морфологии были близки к веретенообразной форме (рис. 5а). Во II и III группах адгезия отсутствовала, что, скорее всего, свидетельствовало о нежизнеспособности полученных конструкций (рис. 5б, 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. 3 и 4.



Рис. 5. Сфероиды ММСК лимба в условиях 2D-культивирования, 7 сутки, световая микроскопия, ув. x100: а) I, интактная группа; б) II группа; в) III группа

Так уровень секреции ФРН в I группе оставался стабильным на протяжении всего периода наблюдения и составлял в среднем  $11785 \pm 389$  пг/мл. Во II и III группах проведение индук-

ции 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 выражен-

ное снижение продукции ФРН в 2 раза, и к 21 суткам его концентрация составляла  $4500 \pm 150,9$  и  $6280 \pm 223,8$  пг/мл, т.е. в 2,5 и 1,8 раз меньше по сравнению с I группой контроля.

Таблица 3

**Динамика содержания фактора роста нервов (ФРН) в инкубационной среде в группах сравнения**

Период наблюдения, сутки	ФРН, пг/мл		
	I группа М±σ	II группа М±σ	III группа М±σ
5	$11420 \pm 245,2$	$14475 \pm 201,7^*$	$10895 \pm 165,7^{**}$
7	$11760 \pm 132,9$	$19102 \pm 135,5^*$	$11570 \pm 156,7^{**}$
9	$12190 \pm 205,2$	$12470 \pm 156,3^{**}$	$14500 \pm 234,5^*$
11	$12230 \pm 201,6$	$9775 \pm 168,7^*$	$19490 \pm 155,9^*$
14	$12060 \pm 252,5$	$8200 \pm 181^*$	$11250 \pm 223,6^*$
17	$11610 \pm 126,5$	$5230 \pm 223,7^*$	$9000 \pm 222,2^*$
21	$11230 \pm 133,7$	$4500 \pm 150,9^*$	$6280 \pm 223,8^*$

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

Таблица 4

**Динамика содержания нейротрофического фактора головного мозга (НФГМ) в инкубационной среде в группах сравнения**

Период наблюдения, сутки	НФГМ, пг/мл		
	I группа М±σ	II группа М±σ	III группа М±σ
5	$590,58 \pm 22,3$	$680,25 \pm 19^*$	$580 \pm 14,1^{**}$
7	$583 \pm 20,57$	$870,7 \pm 20,2^*$	$571 \pm 19,1^{**}$
9	$559,5 \pm 24,5$	$703,5 \pm 21,8^*$	$681 \pm 11,9^*$
11	$537,4 \pm 31,6$	$617,2 \pm 21,5^*$	$871 \pm 18,2^*$
14	$500 \pm 16,32$	$521,8 \pm 23,1^*$	$609,5 \pm 12,35^*$
17	$488,26 \pm 27,1$	$434,4 \pm 27,3^*$	$502 \pm 13,3^*$
21	$461,59 \pm 23,09$	$250,5 \pm 18,9$	$330 \pm 14,1^*$

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

При оценке динамики содержания НФГМ в культуральной жидкости в I группе отмечалось умеренное снижение уровня фактора лишь к концу периода наблюдения: к 21 суткам концентрация составляла  $461,59 \pm 23,09$  пг/мл. Индукция во II и III группах способствовала увеличению содержания НФГМ в 1,5 раза и составляла в среднем  $870,7 \pm 20,2$  и  $871 \pm 18,2$  пг/мл соответственно. Однако в дальнейшем отмечалось выраженное снижение продукции в 3,4 и 2,6 раза и к 21 суткам соответствовало  $250,5 \pm 18,9$  и  $330 \pm 14,1$  пг/мл, т.е. в 1,4 раза меньше по сравнению с группой контроля.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные сфероиды, созданные из 2D-культуры интактных ММСК лимба методом трехмерного культивирования, способны в достаточных терапевтических концентрациях спонтанно синтезировать ФРН и НФГМ, являются наиболее оптимальной конструкцией для трансплантации в экстрабульбарные и интраокулярные тканевые ниши глазного яблока, являются потенциальным источником пролонгированной секреции нейроростовых факторов в клеточной терапии оптических нейропатий.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Борзенко С.А., Онищенко Н.А., Тонаева Х.Д. и др. Сотрансплантация ММСК-подобных клеток лимба способствует местной иммунокоррекции и прозрачному приживлению трансплантата роговицы при кератопластике высокого риска // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. XVI, № 1. – С. 12-20.
2. Гомазков О.А. Старение мозга и нейротрофическая терапия. – М.: ИКАР, 2011. – 92 с.
3. Горкун А.А. Изучение индуцированного васкулогенеза в 3D культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2012. – 25 с.
4. Егоров Е.А., Брезнев А.Ю., Егоров А.Е. Нейропротекция при глаукоме: современные возможности и перспективы // РМЖ «Клиническая офтальмология». – 2014. – № 2. – С. 108-112.
5. Патент РФ № 2475218. Способ выделения и органоинтегративного культивирования аллогенного лимбального трансплантата / 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. – С. 13 с.
6. Baer P.C., Griesche N., Luttmann W. et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness // Cytotherapy. – 2010. – Vol. 12. – P. 96-106.
7. Baraniak P.R., McDevitt T.C. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential // Cell Tissue Res. – 2012. – Vol. 347, № 3. – P. 701-711.
8. Crigler L., Robey R. C., Asawachaicharn A. et al. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. // Exp. Neurol. – 2006. – 198 (1). – P. 54-64.
9. Flammer J., Haefliger I., Orgul S. Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage? // J. Glaucoma. – 1999. – Vol. 8. – P. 212-219.
10. Gnechi M., He H., Liang O.D. et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells // Nat. Med. – 2005. – Vol. 11, № 4. – P. 367-368.
11. Harper M.M., Grozdanic S.D., Blits B. et al. Transplantation of BDNF secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensiverat eyes // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – Vol. 52, № 7. – P. 4506-4515.
12. Hu Y., Tan H. B., Wang X. M. et al. Bone marrow

mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma // Clin. Interv. Aging. – 2013. – № 8. – P. 1467-1470.

13. Levkovitch-Verbin H., Sadan O., Vander S. et al. Intravitreal Injections of Neurotrophic Factors Secreting Mesenchymal Stem Cells Are Neuroprotective in Rat Eyes following Optic Nerve Transection // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2010. – Vol. 51, № 12. – P. 6394-6400.
14. Marotte L.R., Vidovic M., Wheeler E. et al. Brain-derived neurotrophic factor is expressed in a gradient in the superior colliculus during development of the retinocollicular projection // Eur. J. Neurosci. – 2004. – Vol. 20, № 3. – P. 843-847.
15. Park E., Patel A.N. Changes in the expression pattern of mesenchymal and pluripotent markers in human adipose-derived stem cells // Cell. Biol. Int. – 2010. – Vol. 34. – P. 979-984.
16. Pease M.E., McKinnon S.J., Quigley H.A. et al. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2000. – Vol. 41. – P. 764-774.
17. Polisetty N., Fatima A., Madhira S.L. et al. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye // Mol. Vis. – 2008. – Vol. 14. – P. 431-442.
18. Quigley H.A. Neuronal death in glaucoma // Prog. Retin. Eye Res. – 1999. – Vol. 18. – P. 39-57.
19. Quigley H.A., Broman A.T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 // Br. J. Ophthalmol. – 2006. – Vol. 90, № 3. – P. 262-267.
20. Sadan O., Bahat-Stromza M., Barhum Y. et al. Protective effects of neurotrophic factors secreting cells in a 6OHDA rat model of Parkinson disease // Stem. Cells dev. – 2009. – Vol. 18, № 8. – P. 1179-1190.
21. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F. et al. Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro // Exp. Neurol. – 2000. – Vol. 164. – № 2. – P. 247-256.
22. Tolar J., Le Blanc K., Keating A., Blazar B.R. Hitting the right spot with mesenchymal stromal cells (MSCs) // Stem Cells. – 2010. – Vol. 28. – P. 1446-1455.
23. Vercelli A., Mereuta O.M., Garbossa D. et al. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // Neurobiol. Dis. – 2008. – Vol. 31. – № 3. – P. 395-405.
24. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons // Journal of Neuroscience Research. – 2000. – Vol. 61. – № 4. – P. 364-370.

Поступила 22.09.2016

### КНИГИ



#### Пресбиопия / Под ред. О.И. Розановой, А.Г. Шуко. – М.: Издательство «Офтальмология», 2015. – 154 с.

Монография посвящена актуальной проблеме офтальмологии – пресбиопии. В книге последовательно отражены современные представления о механизмах старения организма, описаны структурно-функциональные изменения в зрительной системе при развитии пресбиопии, с позиций общей патофизиологии представлена концепция формирования пресбиопии. Особое внимание в монографии уделено закономерностям изменения зрительного восприятия при утрате аккомодации и современным методам лечения пресбиопии. Книга предназначена для послевузовского образования, рассчитана на врачей-офтальмологов, врачей-патофизиологов, интернов и клинических ординаторов.

Адрес издательства «Офтальмология»: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А. Тел.: 8 (499) 488-89-25. Факс: 8 (499) 488-84-09. E-mail: publish\_mntk@mail.ru