

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С. Н. ФЕДОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Хаценко Евгений Игоревич

**ТЕХНОЛОГИЯ ПОДГОТОВКИ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ
3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО
ЭПИТЕЛИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

14.01.07 – глазные болезни

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Борзенко Сергей Анатольевич

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Фундаментальные и клинические предпосылки трансплантации ретинального пигментного эпителия.....	15
1.2 История развития трансплантации ретинального пигментного эпителия.....	20
1.3 3D клеточные сфероиды как форма трансплантата ретинального пигментного эпителия.....	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1 Дизайн исследования и общий расход материалов.....	32
2.2 Методы культивирования и исследования ретинального пигментного эпителия <i>in vitro</i>	40
2.2.1 Выделение кроличьего ретинального пигментного эпителия, особенности культивирования.....	40
2.2.2 Иммуноцитохимическое исследование 2D культур ретинального пигментного эпителия.....	47
2.2.3 Подготовка ретинального пигментного эпителия к трансплантации методом трехмерного клеточного культивирования.....	50
2.2.4 Оценка морфо-функциональных характеристик 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия.....	52
2.2.5 Сканирующая электронная микроскопия.....	54
2.2.6 Гистологическое исследование.....	57
2.3 Экспериментально-клинические методы трансплантации и исследования ретинального пигментного эпителия <i>in vivo</i>	58
2.3.1 Хирургическая техника трансплантации ретинального пигментного эпителия.....	58
2.3.2 Морфо-функциональные методы исследования глазных яблок кроликов.....	59

2.4 Статистические методы исследования.....	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ С ПОСЛЕДУЮЩИМ КОНСТРУИРОВАНИЕМ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ	62
3.1 Результаты выделения и первичного 2D культивирования ретинального пигментного эпителия.....	62
3.2 Результаты иммуноцитохимического исследования 2D культуры ретинального пигментного эпителия.....	69
3.3 Результаты конструирования и культивирования 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия для трансплантации.....	71
3.4 Результаты исследований морфо-функциональных характеристик 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия.....	75
3.5 Оценка выживаемости и жизнеспособности 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия после нормотермического культивирования.....	79
3.6 Оценка выживаемости и жизнеспособности 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия после краткосрочной гипотермической консервации.....	81
3.6.1 Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия после пребывания в условиях гипотермии.....	81
3.6.2 Результаты исследования адгезивных свойств 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия и способность к спредингу после пребывания в условиях гипотермии.....	83
3.7 Результаты сканирующей электронной микроскопии.....	85
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНИКИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ФОРМЕ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОРОИДОВ.....	89

4.1 Разработка модифицированной микрохирургической техники трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия на глазах кроликов.....	89
4.2 Результаты гистологического исследования.....	92
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЙ И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В РАННЕМ И ОТДАЛЕННОМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ПЕРИОДАХ.....	97
5.1 Клинико-морфологическое обоснование безопасности техники трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия.....	97
5.1.1 Результаты биомикроскопии.....	97
5.1.2 Результаты офтальмоскопии.....	98
5.1.3 Результаты ультразвукового В-сканирования.....	99
5.2 Результаты электроретинографии.....	101
5.3 Результаты оптической когерентной томографии.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
ВЫВОДЫ.....	120
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ.....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126

ВВЕДЕНИЕ

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) играет значительную роль в жизнедеятельности сетчатки глаза, обеспечивая ряд важнейших функций (Simó R. et al., 2010; Strauss O., 2011).

Нарушение работы РПЭ является первым звеном в патогенезе развития дегенеративных заболеваний сетчатки и сопровождается безвозвратной гибелью фоторецепторов (Nussenblatt R. et al, 2009, Schütt F. et al, 2008).

Наиболее распространенным и социально значимым дегенеративным заболеванием сетчатки является возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – это хроническое прогрессирующее дистрофическое заболевание центральной зоны сетчатки, приводящее к постепенному снижению зрения (Бойко, Э.В., 2010; Bhutto I., Luttu G., 2012).

Начальные стадии дегенеративного процесса в сетчатке связаны с нарушением транспортной функции РПЭ, что приводит к её гипоксии, отложению друз на мембране Бруха, субретинальной неоваскуляризации и прогрессирующему снижению зрения (Bindewald A. et al, 2014; Nowak J., 2006).

На сегодня существует ряд методик (консервативные, лазерные и хирургические) лечения ВМД (Арсютов Д.Г., 2014; Балашова Л.М., 2008; Дога А.В., Педанова Е.К., 2017; Захаров, В.Д., 2003; Файзрахманов Р.Р., 2015; Abrishami M. et al, 2009). Однако при далеко зашедших стадиях заболевания прогноз восстановления утраченных зрительных функций является сомнительным. Следовательно, вопрос поиска новых способов лечения ВМД остается актуальным.

В последние десятилетия, в связи с активным развитием микрохирургических технологий и клеточной биологии, по всему миру разрабатываются новые, более эффективные способы лечения ВМД путем

субретинальной клеточной трансплантации (Caramoy A., 2011; Humayun M. et al, 2000; Nita M. et al, 2012).

Однако, данные методики не лишены недостатков, связанных с травматичностью вмешательств, высоким риском осложнений, и, как следствие, невысокими анатомо-функциональными результатами после проведенного оперативного вмешательства. Также открытым остается вопрос о выборе наиболее оптимального трансплантируемого донорского материала (Alexander P. et al, 2015; Falkner-Radler C. et al, 2011, van Meurs J.C., 2004).

В подавляющем большинстве экспериментальных и клинических исследований трансплантация РПЭ осуществляется эндовитреальным доступом (de Juan E., 2010; Thumann G., 2014, Weisz J. 2009).

Все виды используемых клеточных трансплантатов можно условно разделить на 2 вида: суспензия клеток (Crafoord S., 2012; Del Priore L., 2010; Krebs I., 2011) и лоскут хориоидально-пигментного комплекса (ХПК) (Glittenberg C., 2011; Joeres S., 2012; Lai C., 2010). Оба вида предлагаемых трансплантатов имеют свои недостатки.

При субретинальном введении суспензии клеток РПЭ может происходить неконтролируемая диссеминация трансплантатов по субретинальному пространству и в витреальную полость через ретиномическое отверстие. Это приводит к образованию неоднородного и делокализованного слоя РПЭ, а также к развитию пролиферативной витреоретинопатии (ПВР), образованию эпиретинальных мембран (ЭРМ) и тракционной отслойке сетчатки (ОС). Также, при трансплантации суспензии клеток РПЭ обнаруживалось преобладание клеток мезенхимального фенотипа, утративших полярность, что является следствием эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) клеток РПЭ после их удаления с мембраны Бруха. Трансплантация лоскутов ХПК может сопровождаться травматизацией сетчатки и трансплантата, а также высокой частотой

возникновения ОС в послеоперационном периоде. Также в большинстве случаев требует введения тампонирующего вещества – силиконового масла (СМ), что подразумевает проведение второго этапа операции по поводу его удаления (Caramou A., 2011; Joeres S., 2008; Uppal G., 2009).

Таким образом современная методика трансплантации РПЭ должна отвечать следующим критериям:

1. вмешательство должно быть малотравматичным, малоинвазивным и выполняться в один этап;
2. клеточный материал должен быть этически допустимым в клинической практике;
3. трансплантаты должны быстро адгезироваться к мембране Бруха, не диссеминировать по субретинальному пространству и в витреальную полость, а также не трансформироваться в мезенхимальную ткань.

Предполагается, что трансплантация аллогенного РПЭ, культивированного в форме многоклеточных микроагрегатов (3D сфероидов) эндовитреальным доступом позволит снизить риски вышеперечисленных осложнений.

Сфероид – это форма 3D клеточной культуры, в которой клетки приближены к условиям нативной ткани. Клетки внутри сфероида объединены межклеточными связями, что не позволяет им спонтанно диссеминировать, а общая масса сфероида делает возможным его быстрое оседание в толще жидкости и адгезирование к плоской поверхности с последующим проявлением спрединга (распластывание с образованием клеточного слоя). Характер межклеточных взаимодействий в сфероиде является профилактикой центральных некрозов клеток внутри сфероида, защищает клетки от апоптоза (Korff T., 1998) и делает их более устойчивыми к неблагоприятным факторам внешней среды. Эпителиальные клетки

наружных слоев сфероидов образуют конгломерат, имеющий признаки естественной тканевой морфологии – полярность клеток, плотные межклеточные контакты, коллагеновые и гликозаминогликановые фибриллы десмосом и мембранных вдавлений. В сфероиде также наблюдаются функциональное разделение клеток, соответственно их локализации – поверхностные слои содержат большое количество митотирующих клеток, имеющих признаки эпителия, а клетки внутреннего – гипоксигенированного слоя, находятся в состоянии динамического покоя (Борзенко С.А., 2014; Сабурова И.Н., 2014).

При этом, трансплантация 3D сфероидов РПЭ требует проведения доклинических исследований. Традиционной моделью для экспериментальных исследований в офтальмологии являются кролики ввиду анатомической схожести кроличьего глаза с глазом человека и экономической доступностью данного биоматериала. На сегодня в доступной литературе отсутствуют работы, описывающие технику выделения кроличьего РПЭ, его культивирования для создания 3D сфероидов, а также методику их трансплантации, что и послужило основанием к выбору цели данного исследования.

Цель настоящего исследования

Разработка технологии предоперационной подготовки и техники трансплантации 3D клеточных сфероидов аллогенного ретинального пигментного эпителия в опыте на животных (кролики).

Задачи исследования

1. Разработать метод конструирования трансплантатов 3D клеточных сфероидов из аллогенного ретинального пигментного эпителия кроликов.

2. Разработать хирургическую технику субретинальной трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте *in vivo*.

3. Провести морфологическое исследование внутриглазных оболочек кроликов после трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия с помощью гистологического исследования.

4. Провести клинко-морфологическое обоснование безопасности техники трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия с помощью биомикроскопии, офтальмоскопии и ультразвукового (УЗ) В-сканирования.

5. Изучить клинко-морфологическое состояние сетчатки кроликов после трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия с помощью оптической когерентной томографии.

6. Исследовать функциональное состояние нейросенсорной сетчатки кроликов после трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия посредством электроретинографии.

Научная новизна

1. Впервые показана возможность создания жизнеспособных трансплантатов 3D клеточных сфероидов необходимого диаметра с заданным количеством клеток из аллогенного РПЭ кроликов, а также доказано, что трехмерное культивирование позволяет сохранить клеточный фенотип кроличьего РПЭ.

2. Впервые разработана микроинвазивная техника субретинальной трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов на глазах кроликов, что позволяет проводить оперативное вмешательство одноэтапно и с минимальной травматизацией клеточных трансплантатов и тканей глаз реципиентов.

3. Впервые с помощью гистологического исследования показано, что 3D сфероиды РПЭ, трансплантируемые субретинально, быстро адгезируются и распластываются на нативном РПЭ реципиентов, образуя новый клеточный слой РПЭ не оказывая негативного влияния на состояние внутриглазных оболочек – сетчатку и хориоидею.

4. Впервые доказана безопасность разработанной техники трансплантации 3D сфероидов РПЭ посредством биомикроскопии, офтальмоскопии и УЗ В-сканирования.

5. Впервые посредством ОКТ показано, что 3D сфероиды РПЭ, трансплантируемые по предложенной технологии, доставляются в субретинальное пространство, а морфологические изменения состояния сетчатки в раннем послеоперационном периоде являются незначительными и обратимыми.

6. Впервые посредством ЭРГ доказано, что полное восстановление функционального состояния нейросенсорной сетчатки у кроликов после трансплантации 3D сфероидов РПЭ происходит на 20-е – 30-е сутки после проведения оперативного вмешательства.

Практическая значимость

1. Разработанная технология выделения, культивирования и конструирования 3D трансплантатов РПЭ в виде сфероидов методом трехмерного культивирования является оптимальной экспериментальной моделью для дальнейшей субретинальной трансплантации и позволяет использовать ее на других животных.

2. Разработанная микрохирургическая техника в эксперименте на кроликах, заключающаяся в проведении микроинвазивной 25G витрэктомии, ретинопунктуры и субретинальном введении 3D сфероидов РПЭ позволяет

безопасно доставлять клеточные трансплантаты в субретинальное пространство и может быть применима в опытах по трансплантации на других видах животных, а также в дальнейшем быть применима для оперативного вмешательства на глазах человека.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная технология предоперационной подготовки кроличьего РПЭ, заключающаяся в трехмерном клеточном культивировании с последующим конструированием 3D сфероидов с использованием неадгезивных агарозных планшетов позволяет получать трансплантаты заданного диаметра с определенным количеством клеток и с сохранением их фенотипа, что подтверждается данными иммуноцитохимических и морфо-функциональных исследований *in vitro*.

2. Разработанная в эксперименте на кроликах микрохирургическая техника, заключающаяся в проведении 25G витрэктомии, ретинопунктуры и субретинальном введении 3D сфероидов РПЭ с тампонадой витреальной полости воздухом, позволяет доставлять клеточные трансплантаты в субретинальное пространство одноэтапно при биологически безопасных и обратимых осложнениях, что подтверждается гистологическими, клиническими и морфо-функциональными исследованиями.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XII Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» (г. Москва, 20 июня 2018 г.), на научно-клинической конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (г. Москва, 14 декабря 2018 г.), на XVII Всероссийской научно-практической конференции с международным

участием «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (г. Сочи, 22 марта 2019 г.), на XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (г. Москва, 27 июня 2019 г.).

Внедрение в практику

Результаты исследования внедрены в практику в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (ЦФПМБП) ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, на их основе проводятся доклинические испытания в Головной организации, а также в Калужском, Краснодарском и Санкт-Петербургском филиалах ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, а также включены в цикл лекций по основам трансплантологии и регенеративной медицины для клинических ординаторов, аспирантов и курсантов в Научно-педагогическом центре ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и кафедры Глазных болезней Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 3 в журналах, рецензируемых ВАК РФ. Получен патент РФ на изобретение № 2704094 от 22.08.2019.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 141 странице, содержит 14 таблиц и 38 рисунков. Работа состоит из введения и 5 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, три главы результатов

собственных исследований *in vitro* и *in vivo*, содержит общее заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы состоит из 140 источников, включающих 19 отечественных и 121 иностранных публикаций.

Фундаментальная часть исследования *in vitro* выполнена на базе ЦФПМБП ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заведующего Центром, д.м.н., профессора, академика РАЕН Борзенка С.А., при непосредственном участии заведующей Глазным тканевым банком, к.м.н. Хубецовой М.Х. и научного сотрудника, к.б.н. Островского Д.С.

Экспериментальные исследования *in vivo* выполнены на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (директор – д.м.н. Терещенко А.В.) под руководством заместителя директора по научной работе, к.м.н. Трифаненковой И.Г. и, при непосредственном участии заведующего операционным блоком, к.м.н. Плахотного М.А. и заведующей диагностическим отделением №2, к.м.н. Ерохиной Е.В.

Гистологические исследования выполнены на базе Лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заведующей лаборатории, к.м.н. Шацких А.В.

Приношу глубокую благодарность за научное становление моему научному руководителю, заведующему ЦФПМБП ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, д.м.н., профессору, академику РАЕН Борзенку С.А. Искренне благодарю директора ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России д.м.н., проф. А.М. Чухраёва, к.б.н. Островского Д.С., к.м.н. Хубецову М.Х., к.м.н. Шацких А.В., к.м.н. Трифаненкову И.Г., к.м.н.

Плахотного М.А. и к.м.н. Ерохину Е.В. за поддержку и помощь при выполнении работы.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследования и разработке концепции экспериментального исследования, осуществлял сбор материала для исследования, участвовал и самостоятельно проводил экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo*. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фундаментальные и клинические предпосылки трансплантации ретинального пигментного эпителия

Термин «возрастная макулярная дегенерация» был впервые предложен О. Хаабом в 1885 г. [66]. На сегодня ВМД является одной из ведущих причин снижения зрения у людей старшей возрастной группы. В возрасте 65-74 лет около 20% слепых приходится на долю ВМД, в возрасте старше 75 лет – около 50% от общего числа слепых, а частота встречаемости ВМД в Российской Федерации составляет 15 случаев на 1000 человек, из которых 11% являются лицами трудоспособного возраста [8]. По данным Всемирной организации здравоохранения, на 2010 год, количество лиц, страдающих ВМД, в мире составляло 30-50 миллионов, из которых около 4 млн. человек были юридически слепы (слепота, согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра, определяется как максимально скорректированная острота зрения (МКОЗ) менее 0,05 или как поле зрения не более 10° во всех меридианах вокруг центральной точки фиксации на лучше видящем глазу с максимальной коррекцией) [72], и, по всей вероятности, количество таких пациентов будет расти соразмерно количеству населения и увеличению средней продолжительности жизни [100, 135].

В 1971 году Р. Махемером был изобретен витреотом, что стало началом современной эндовитреальной хирургии через pars plana и позволило оперировать ранее недоступные структуры – стекловидное тело и сетчатку, и впоследствии открыло возможности проводить операции с отдельными слоями сетчатой оболочки, в том числе и начать первые попытки субретинальной трансплантации РПЭ [94].

Идея трансплантации РПЭ как метода лечения дегенеративных заболеваний сетчатки сформировалась к концу 20 века, когда для этого сложились необходимые предпосылки:

1. Были подробно изучены строение сетчатки, функции её отдельных слоёв, а также роль РПЭ в патогенезе развития дегенеративных заболеваний сетчатой оболочки [65, 69].

2. Изучено поведение клеток РПЭ *ex vivo* – разработаны способы выделения и культивирования. По сравнению с клетками нейросенсорной сетчатки РПЭ считался более пластичным и жизнеспособным материалом в условиях *in vivo* [59, 60].

3. Доказано, что ВМД является одной из ведущих причин необратимого снижения зрения у лиц старшей возрастной группы при недостатке эффективных средств лечения [88, 138].

4. Появились технические возможности – развитие витреоретинальной хирургии позволило проводить микроинвазивные оперативные вмешательства на заднем отрезке глаза при достаточно невысоких рисках осложнений.

Ведущую роль в патогенезе развития ВМД играет дисфункция РПЭ, что связано с многофункциональностью этого клеточного слоя в обеспечении метаболических процессов в нейросенсорной сетчатке. На сегодня известно 8 функций РПЭ [34, 103, 106, 112, 116]:

1. транспорт кислорода, питательных веществ, метаболитов;
2. фагоцитарное обновление наружных сегментов фоторецепторов;
3. ограничение светорассеяния внутри глазного яблока;
4. снижение фототоксического действия попадающего внутрь глаза света на фоторецепторы;
5. образование гематофтальмического барьера;
6. прилегание нейросенсорной сетчатки к хориоиде;

7. рубцевание в очаге воспаления;
8. Участие в паракринной регуляции заднего отрезка глаза.

Патогенез развития ВМД связан с естественным процессом старения организма и различными триггерными факторами (курение, злоупотребление алкоголем, чрезмерное пребывание на солнце, ожирение, сахарный диабет, гипертоническая болезнь, авитаминозы, этнические особенности – европеоидная раса и др.). Нарушение транспортной и фагоцитарной функций РПЭ приводит к избыточному накоплению липофусцина на мембране Бруха, который откладывается в виде друз («сухая» форма ВМД). Дальнейшее снижение гемато-ретиального транспорта вызывает хроническую гипоксию сетчатки, что провоцирует выделение фактора роста эндотелия сосудов клетками РПЭ. Конечным итогом является субретинальная неоваскуляризация с последующей необратимой гибелью фоторецепторов центральной зоны сетчатки («влажная» форма ВМД) [4, 28, 48, 103].

На сегодня имеется ряд методик лечения ВМД, обладающих различной степенью эффективности на определенных стадиях заболевания:

1. Метаболическая терапия биодобавками, витаминами и полипептидными комплексами – иногда может быть эффективна в целях профилактики ВМД и на начальных стадиях заболевания при «сухой» форме [2, 23, 24, 25].

2. Интравитреальное введение anti-VEGF препаратов (Бевацизумаб, Ранибизумаб, Аfliберцепт) – достаточно эффективно подавляет процессы неоваскуляризации, однако данный вид лечения зачастую требует неоднократных инъекций, является дорогостоящим, при давности патологического процесса не приводит к значимому улучшению зрения, и, при этом, не исключается риск рецидива неоваскуляризации. Также, при наличии «скрытой» субретинальной неоваскулярной мембраны (СНМ) – расположенной под РПЭ, эффективность

anti-VEGF терапии является минимальной и требует значительного увеличения количества интравитреальных инъекций [12, 54, 55].

3. Фотодинамическая терапия – методика заключается во внутривенном введении раствора фотосенсибилизатора, накапливающегося в патологически измененных сосудах, с последующей световой активацией лазером. Результатом процедуры является фотоиндуцированный тромбоз аномальных новообразованных сосудов. Данный метод применяется при «влажной» ВМД при отсутствии выраженной положительной динамики на anti-VEGF терапию или в комбинации с интравитреальными инъекциями ингибиторов неоваскуляризации. Фотодинамическая терапия в большей степени направлена на сохранение остаточных зрительных функций, а не на улучшение зрения, т.е. для стабилизации патологического процесса, а также для снижения количества повторных интравитреальных инъекций ингибиторов неоваскуляризации [6, 11, 17, 32, 58, 97].

4. Хирургическое удаление СМ и/или субретинального фиброза (СРФ) –эндовитреальное вмешательство, заключающееся в проведении трехпортовой микроинвазивной витрэктомии и ретиномии в парамакулярной зоне с последующим удалением патологической субретинальной ткани. Данная методика может сопровождаться травмой нейросенсорной сетчатки и хориоидеи, не приводит к существенному улучшению зрения и больше направлена на сохранение остаточных зрительных функций. Также остается открытым вопрос о закрытии дефекта в слое РПЭ после такого вида хирургического вмешательства [1, 18, 129, 130].

5. Транслокация макулы – ротация сетчатки с целью переместить макулярную зону с патологически измененного участка хориоидеи на здоровый – с интактным пигментным эпителием. Для достижения этой цели необходимо провести витрэктомию, вызвать искусственную тотальную ОС, периферическую круговую ретиномию, развернуть сетчатку вокруг диска зрительного нерва (ДЗН) и зафиксировать ее в новом положении после

удаления патологической субретинальной ткани. Операция завершается круговой эндолазеркоагуляцией сетчатки (ЭЛК) и тампонадой витреальной полости «легким» СМ. Для предупреждения циклофории до ротации сетчатки необходимо развернуть глазное яблоко на аналогичный угол в противоположную сторону проведя операцию на глазодвигательных мышцах. Предлагаемая хирургическая техника зачастую позволяет значительно повысить исходную остроту зрения, однако является высоко травматичной и требует проведения длительного вмешательства на заднем отрезка глаза и глазодвигательных мышцах. При этом в послеоперационном периоде не исключается риск возникновения таких осложнений как: косоглазие, астенопия, ОС, гемофтальм, ПВР, прогрессирование ВМД. Проведение данного вмешательства может быть показано пациентам с достаточно высокой дооперационной остротой зрения (от 0.1) с относительно сохранными фоторецепторами и не приносит положительных результатов при низкой остроте зрения (ниже 0.1) с выраженными атрофическими изменениями в нейросенсорной сетчатке [7, 53, 95].

Существует две стратегии клеточной трансплантации при далеко зашедших стадиях ВМД [108]:

1. Замена погибших фоторецепторов на донорские зрелые фоторецепторы или их зрелые прогениторы со стволовыми свойствами.
2. Спасение сетчатки путем субретинальной трансплантации РПЭ, что позволяет воздействовать на центральное звено патогенеза ВМД.

Однако дискуссионным остается вопрос о целесообразности трансплантации фоторецепторов в область атрофического хориокапиллярного слоя, утолщенной мембраны Бруха и дисфункционального РПЭ, что имеет место при далеко зашедших стадиях ВМД [44, 70]. И наоборот, имеются данные о неэффективности субретинальной трансплантации РПЭ в зону с атрофией фоторецепторов, однако не исключает возможность проведения

данного вида оперативного вмешательства на начальных стадиях заболевания при наличии жизнеспособных фоторецепторов сетчатки [91].

Наиболее распространенной и удобной моделью исследования в физиологии и патологии клеток сетчатки с целью последующей трансплантации является клеточная культура *in vitro* изолированных клеток РПЭ. Первые работы по выделению и *in vitro* культивированию РПЭ относятся к началу 20-го века [121], а к 1980 году были получены успешные и воспроизводимые протоколы, положенные в основу первых работ по трансплантации РПЭ [60]. Нельзя не отметить, что РПЭ (как зрелый, так и фетальный) ни в одном экспериментальном или клиническом исследовании не был замечен в онкологическом перерождении в случае его субретинальной трансплантации, что снимает ряд биоэтических возражений при его использовании и объясняет тот факт, что среди всех публикаций, посвященных клеточной трансплантации в области заднего отрезка глаза, большинство посвящено именно трансплантации РПЭ [102].

1.2 История развития трансплантации ретинального пигментного эпителия

Первая статья, посвященная субретинальной трансплантации РПЭ была опубликована в 1985 г. Gouras P. с соавторами [63]. Ученые трансплантировали обезьянам клетки человеческого РПЭ, меченные тимидином, используя доступ *pars plana* через ретинопунктурное отверстие. С помощью радиографии было показано, что уже через 2 часа происходит частичная адгезия трансплантируемых клеток, и в течение 2 – 7 дней образовывался монослой на мембране Бруха. В течение этого времени под суспензией РПЭ появлялись макрофаги в хориокапиллярах, однако фагоцитоза трансплантатов замечено не было. Присоединение отслоенной

нейросенсорной сетчатки к слою трансплантата не предпринималось, но авторы заявили, что это представляется технически возможным.

С тех пор по настоящее время проблема трансплантации РПЭ многими современными авторами не является «тупиковой», и потому на современном этапе активно изучается в ведущих научных офтальмологических центрах Европы и США.

По мнению других авторов при планировании трансплантации РПЭ должны решаться как минимум два вопроса – каков источник клеток РПЭ и в какой форме РПЭ будет трансплантирован [26, 90, 108, 111, 139].

По своему происхождению клетки пигментного эпителия могут быть аутологичными или аллогенными. Аутологичные могут быть зрелыми клетками РПЭ, либо производными индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPSCs). Аллогенные могут быть получены от взрослого донора или от донора-плода, либо являться производными человеческих эмбриональных стволовых клеток (human embryonic stem cells, hESCs).

По своей форме трансплантат РПЭ может представлять собой суспензию клеток или монослой клеток в составе тканевого лоскута на мембране Бруха.

подавляющее большинство работ, посвященных трансплантации РПЭ, проводятся эндовитреальным доступом через pars plana после проведения микроинвазивной субтотальной витрэктомии. Работы, описывающие технику субретинальной трансплантации РПЭ трансклеральным доступом в эксперименте на животных, не получили распространения ввиду невозможности применения такого оперативного доступа на человеческом глазу и высокого риска трансплантации суспензии клеток РПЭ в другие зоны – в супрахориоидальное пространство и в витреальную полость [52, 119, 134, 140].

В качестве методов послеоперационного контроля проводили стандартное и специализированное офтальмологическое обследование, включающее: ОКТ сетчатки, ЭРГ, микропериметрию и флюоресцентную ангиографию (ФАГ). В случае проведения опытов на животных проводили гистологическое исследование.

В доступных литературных источниках трансплантация РПЭ проводилась при «влажной» или «рубцовой» ВМД, а также при географической атрофии [38, 133] и пигментном ретините [109, 110]. Клетки вводились после удаления фибро-вазкулярных мембран. Данное сочетание вмешательств представляется вполне удачным, так как, по данным литературы, само по себе удаление фибро-вазкулярной мембраны может приводить к улучшению зрения примерно в 1/3 случаев. Однако в равных долях зрение после такого вмешательства может оставаться на неизменном уровне или же может ухудшиться вследствие травматичного удаления слоя РПЭ как в проекции мембраны, так и вокруг нее [115, 129].

Впоследствии рядом ученых также были предприняты попытки субретинальной трансплантации аллогенного РПЭ в форме суспензии в опыте на кроликах и обезьянах. Однако данные работы не получили широкого клинического применения ввиду описанных авторами осложнений, а именно: неконтролируемая диссеминация клеток по субретинальному пространству и в витреальную полость через ретинопунктурное отверстие, что приводило к образованию неоднородного и делокализованного слоя РПЭ под сетчаткой, а также к развитию ПВР, образованию ЭРМ и возникновению ОС. Также после трансплантации суспензии клеток РПЭ при проведении ОКТ обнаруживалось наличие СРФ с последующей атрофией фоторецепторов сетчатки, что свидетельствует об ЭМТ клеток РПЭ после их удаления от мембраны Бруха [56, 89, 93, 137].

В 1991 г. Реуман Г.А. с соавторами была опубликована первая статья, посвященная клинической ауто трансплантации ХПК [107]. Авторы проводили

двум пациентам с «рубцовой» ВМД витрэктомию, ретиномтомию в верхне-наружном и нижне-наружном квадрантах с последующим удалением патологически измененной субмакулярной ткани. Далее с периферических отделов глаза витреотомом выкраивали аутооттрансплантат в виде лоскута ХПК и укладывали субмакулярно. Операции завешались проведением периферической ЭЛК сетчатки и тампонадой витреальной полости СМ. Результаты оказались довольно многообещающими для того времени. В первом случае острота зрения у пациента повысилась со 0.01 до 0.05 и оставалась стабильной на протяжении 1 года. У второго пациента острота зрения осталась на неизменном уровне и через 10 месяцев произошла инкапсуляция трансплантата с образованием неоваскулярной мембраны без признаков неоваскуляризации.

Рядом авторов также были предприняты попытки аутооттрансплантации лоскутов ХПК. Однако всеми учеными был отмечен ряд серьезных осложнений, таких как: ПВР, ОС, гемофтальм, повышение внутриглазного давления (ВГД). Возникновение ЭРМ и ОС авторы связывают с попаданием большого количества клеток РПЭ в витреальную полость во время проведения ретиномтомии, а также из-за значительного объема ЭЛК сетчатки. Кровоизлияния в витреальную полость также происходили во время ретиномтомии при пересечении крупных сосудов сетчатки. Повышение ВГД было связано с избыточной тампонадой витреальной полости силиконовым маслом, его миграцией в переднюю камеру или эмульгацией. Также следует отметить, что данный вид оперативного вмешательства является двухэтапным, т.к. требует проведения второго этапа операции по поводу удаления силиконового масла. Однако с появлением нового микроинвазивного хирургического инструментария калибров 25-27G, а также новых эндолазеров и СМ количество этих осложнений было существенно снижено [41, 42, 67, 74, 75, 96].

Наилучшие результаты, посвященные аутотрансплантации ХПК были опубликованы Сагамоу А. с соавторами в 2010 году. Васкуляризация в зоне трансплантата сохранялась у 9 пациентов из 10 в течение 3 лет, что подтверждалось данными ФАГ. В 3 случаях расположение трансплантата было эксцентричным и острота зрения осталась на неизменном уровне. У остальных пациентов было отмечено значимое улучшение зрения и составило от 0.1 до 0.5. У пациентов появилось центральное зрение с умеренными метаморфопсиями [37].

С 1999 года появились первые экспериментальные и клинические работы, описывающие технику субретинальной аутотрансплантации пигментного эпителия радужки. Авторы выполняли коллобому радужной оболочки, отделяли пигментный эпителий и инъецировали субретинально. Несмотря на относительную простоту и микроинвазивность предложенной хирургической техники, работы, посвященные аутотрансплантации РПЭ радужки, не получили широкого распространения ввиду низких функциональных результатов, по всей видимости связанных с малым количеством трансплантируемых клеток, диссеминации по субретинальному пространству и в витреальную полость, а также с ЭМТ клеток [3, 20, 43, 124, 131].

Впоследствии стали появляться работы, сравнивающие вышеперечисленные методики. Однако, авторами из разных научных офтальмологических центров были опубликованы не вполне сопоставимые данные. Так, Falkner-Radler С.І. с соавторами в 2011 году опубликовали результаты трансплантации РПЭ в форме аутотрансплантата ХПК и суспензии аллогенного РПЭ. Учеными были прооперированы 14 пациентов, разделенных на 2 равные опытные группы случайным образом. По данным авторов результаты после обеих методов трансплантации РПЭ оказались сопоставимыми [57]. Однако Сагамоу А. в 2011 году был сделан вывод о том, что аутотрансплантация ХПК протекает с большим процентом приживления

по сравнению с трансплантацией аутологичного пигментного эпителия радужки и что сопровождается более высокими функциональными результатами в отдаленном периоде в течение 3 лет [35].

В 1994 г. Algvere P.V. с соавторами была опубликована первая статья, посвященная субретинальной трансплантации фетального лоскута РПЭ (гестационный возраст 15-17 недель) пяти пациентам с ВМД. В трех случаях трансплантаты были размещены субфовеолярно, в двух случаях были размещены парафовеолярно. С помощью ФАГ была доказано трехмесячная выживаемость трансплантатов, а также рост трансплантатов с последующим частичным замещением дефектов в слое РПЭ реципиентов. Однако зрение не улучшилось ни в одном случае вследствие кистозного макулярного отека в центральной зоне сетчатки [27]. Однако, несмотря на обнадеживающие результаты, субретинальная трансплантация фетального донорского материала представляет интерес различных ученых и по сей день [9, 110, 126]. Тем не менее, авторы сразу столкнулись с рядом существенных осложнений, а именно: травматизация лоскута, укладка лоскута противоположной стороной, децентрация лоскута, инкапсуляция лоскута с последующей трансформацией в СРФ, макулярный отек, гемофтальм, образование ЭРМ и возникновение ОС. Также следует отметить, что проведение ретиномического отверстия требует проведения ЭЛК сетчатки в парацентральных отделах и тампонады витреальной полости СМ. Однако, по мере отработки хирургической техники и разработки новых инжекторов для трансплантации лоскутов, количество вышеуказанных осложнений было существенно снижено и другие иностранные ученые стали публиковать аналогичные работы, в ряде случаев сообщая о положительных результатах.

Первые успешные экспериментальные и клинические работы, посвященные субретинальной трансплантации стволовых клеток фетального РПЭ в форме суспензии стали проводиться в начале 2000-х годов в Глазном институте им. Е. Roski (Лос-Анжелес, США) под руководством М. Humayun.

Суспензию вводили через ретинопунктурное отверстие в парацентральных отделах сетчатки без силиконовой тампонады витреальной полости и ЭЛК. Трансплантация фетального РПЭ в форме суспензии протекала со значительно меньшим количеством осложнений, пациенты демонстрировали как стабилизацию, так и улучшение зрительных функций [49, 133]. Однако на использование фетального трансплантационного материала на сегодня практически во всем странах (кроме Великобритании и США) наложен этический мораторий, и, несмотря на очевидные преимущества в морфологическом приживлении и восстановлении зрительных функций, его использование представляется проблематичным с легитимной точки зрения. При его использовании могут иметь место значительные этические ограничения к применению, особенно в случае успешной разработки эффективной клинической технологии и появления экономических интересов.

Нельзя не отметить, что любая трансплантация донорских клеток и тканей по определению должна сопровождаться иммуносупрессивным пособием. Однако авторами в вышеуказанных работах в большинстве случаев были получены удовлетворительные результаты трансплантации РПЭ без применения иммуносупрессивной терапии. Так, иммуносупрессия применялась лишь несколькими авторами [45, 86, 133], которые связывали неудовлетворительные результаты после трансплантации РПЭ именно с отказом в назначении иммуносупрессивной терапии в послеоперационном периоде. В подавляющем же большинстве случаев положительные результаты достигались без применения иммуносупрессивных препаратов. Авторы отмечают прямую зависимость между сохранением целостности гематоретинального барьера и вероятностью возникновения реакций отторжения. Данный феномен объясняется явлением «иммунной привилегированности» субретинального пространства [81, 101]. Это может быть связано с тем обстоятельством, что ткани глаза, выполняющие функции светопреломления и светопропускания, защищены от развития

воспалительных реакций, протекающих по классическим механизмам, так как они являются бессосудистыми образованиями и отделены от ближайших сосудистых русел гематофтальмическими барьерами. К таким структурам относятся роговица, хрусталик, стекловидное тело и макула. Следовательно, если бы воспалительные реакции в данных структурах глаза развивались по классическим патофизиологическим механизмам, то в любой из этих структур неизбежно наступила бы потеря зрения, поскольку ткани глаза, как и центральной нервной системы, не способны к репаративной регенерации [39, 79]. Также рядом авторов было установлено, что клетки РПЭ играют немаловажную роль в регуляции иммунного ответа при прямом контакте с Т-лимфоцитами и дендритными клетками [47, 104], а также в опосредованном выделении растворимых ингибирующих факторов [73, 76]. Таким образом, одним из главных условий для успешной субретинальной трансплантации РПЭ является сохранение целостности гематофтальмического барьера, в том числе мембраны Бруха и ретинальных сосудов.

Таким образом, подводя итог вышеизложенному, на сегодня имеются следующие проблемы в трансплантации РПЭ:

1. Ненаправленная диссеминация и рефлюкс клеток в витреальную полость с развитием пролиферативных осложнений, а также неоднородность образуемого слоя при введении клеточной суспензии.
2. Высокая травматичность и частота осложнений при трансплантации ХПК и фетальных лоскутов.
3. Этические проблемы при использовании фетального донорского материала.
4. ЭМТ трансформация клеточных трансплантатов.

Таким образом, в ходе изучения источников литературы, было установлено, что предлагаемые хирургические техники трансплантации РПЭ

имеют ряд недостатков и могут сопровождаться высоким риском осложнений, и, как следствие, невысокими анатомо-функциональными результатами. Это и стало поводом к изучению зрелых прогениторных клеток донорского РПЭ, как доступного и легитимного источника трансплантационного материала.

1.3 3D клеточные сфероиды как форма трансплантата ретинального пигментного эпителия

Для культивирования клеток и тканей многоклеточного организма с целью поддержания их жизнеспособности *in vitro* наиболее простым и воспроизводимым способом является 2D культивирование (*англ.* two-dimensional, двухмерный) – это инкубирование клеточных культур на поверхности плоских субстратов – чашек Петри или культуральных матрасов. При этом делящиеся и расплывающиеся на плоскости клетки могут неограниченно разрастаться, но только в горизонтальной плоскости субстрата. Толщина 2D культуры у большинства зрелых соматических клеток ограничена и может составлять не более 2-3 слоев [85].

Иначе дело обстоит с микроскопическими 3D (*англ.* three-dimensional, трехмерный) культурами клеток, имеющими три равноценные степени свободы, где клетки проявляют тенденцию к агрегации с последующей установкой межклеточных контактов и образованием микроструктур с минимальным соотношением поверхность/объем, т.е. сферических [16, 61].

Характер межклеточных взаимодействий в сфероиде является профилактикой центральных некрозов клеток внутри сфероида, защищает клетки от апоптоза [84], а также делает их более устойчивыми к разрушению ионизирующей радиацией, гипертермии, ультразвуку и химиотерапевтическим агентам, что было объяснено изменениями функции клеточных сигнальных систем в клетках, объединенных в сфероид [50, 51]. В отличие от 2D культур, эпителиальные клетки наружных слоев сфероида

образуют конгломерат, имеющий признаки естественной тканевой морфологии – полярность клеток, плотные межклеточные контакты, коллагеновые и гликозаминогликановые фибриллы десмосом и мембранных вдавлений [92]. Также в сфероиде наблюдаются функциональное разделение клеток, соответственно их локализации: поверхностные слои содержат большое количество митотирующих клеток, имеющих признаки эпителия, а клетки внутреннего – гипоксигенированного слоя, находятся в состоянии динамического покоя [31].

С точки зрения процессов клеточного движения трансплантируемые сфероиды в толще ткани проявляют эффекты спраутинга (*англ.* sprouting – выпускание отростков в разные стороны) [78], а на плоской поверхности – эффект спрединга (*англ.* spreading – распластывание с образованием клеточного слоя) [123].

Культивирование аллогенных клеток в форме 3D клеточных сфероидов для последующей трансплантации в последнее время является одним из молодых и перспективных направлений в современной трансплантологии. На сегодня имеются экспериментальные работы, посвященные трансплантации сфероидов гепатоцитов («искусственная печень») [82], хондроцитов [113], фибробластов [127], гладкомышечной ткани [29], костной ткани [77], щитовидной железы [132], периферической крови [117], костного мозга [83] и ряда эпителиальных тканей: эпителия щитовидной железы [62], носовой полости [33], носоглотки [31], двенадцатиперстной кишки [30], печеночных протоков [84], поджелудочной железы [68], простаты [87], дыхательных путей [105], а также гибридных, «гетеро-сфероидов» из клеток разных типов [122].

В офтальмологической литературе представлены публикации по исследованию сфероидов из эпителия хрусталика [80], клеток трабекулярной сети [99], прогениторных клеток глазного лимба [19], человеческого РПЭ [15, 114], кератоцитов роговицы [10], а также имеются работы, в которых «сфероидом» или «микроагрегатом» называется псевдозамкнутый фрагмент

сетчатки, полученный в ротационной культуре ткани [64]. Причем, все известные к настоящему моменту работы, так или иначе связанные с изучением сфероидов, построенных из клеток глаза, являются экспериментальными.

В 2014 году С.А. Борзенком с соавторами была впервые показана возможность конструирования жизнеспособных 3D сфероидов для трансплантации из трупного человеческого РПЭ с заданным количеством клеток, а также была разработана оригинальная техника выделения РПЭ и подробно описана технология его культивирования. Экспериментальное исследование также подтвердило гипотезу о том, что 3D культивирование позволяет сохранять неизменным фенотип клеток РПЭ [5]. Помимо этого, в работе подробно изложены такие свойства 3D сфероидов РПЭ, как:

1. Определенный диаметр – от 50 до 700 мкм (в зависимости от заданного количества клеток в сфероиде);
2. 3D сфероиды РПЭ в толще жидкости быстро адгезируются к плоской поверхности (в том числе и к мембране Бруха), что может помочь снизить риск их диссеминации при субретинальной трансплантации;
3. адгезированные 3D сфероиды РПЭ проявляют спрединг – распластывание и образование вокруг себя клеточного монослоя;
4. функциональное разделение клеток по слоям соответственно их локализации, позволяющее снизить риск ЭМТ для сохранения фенотипа клеток.

Следовательно, трансплантация зрелого аллогенного РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов может обладать рядом преимуществ по сравнению с уже известными способами трансплантации РПЭ, к которым относятся:

1. Микроинвазивность, как при трансплантации клеток РПЭ в форме суспензии.

2. Ограничение самопроизвольной диссеминации клеток, как при трансплантации суспензии РПЭ.

3. Явление спрединга слоя клеток, аналогично наблюдаемому при трансплантации фрагментов фетальной ткани.

4. Сохранение фенотипа трансплантируемой культуры.

5. Легитимность экспериментального и клинического использования зрелого аллогенного материала в рамках действующего законодательства.

Анализ литературных источников показал, что в области трансплантации РПЭ имеются две проблемы: несовершенство предлагаемого биологического материала для трансплантации и травматичность вмешательства с высоким риском осложнений. Клетки РПЭ, трансплантируемые в форме суспензии, могут диссеминировать в витреальную полость с развитием пролиферативных осложнений и по субретинальному пространству, образуя неравномерный клеточный слой. Трансплантация лоскутов в виде ХПК может сопровождаться травматизацией трансплантата и требует проведения ретиномического отверстия в парацентральных отделах с последующей ЭЛК сетчатки, а также зачастую требует тампонады витреальной полости СМ. Также, при трансплантации РПЭ как в форме суспензии, так и в виде лоскута, возможна трансформация клеточного материала в мезенхимальную ткань, что приводит к развитию СРФ и низким анатомо-функциональным результатам. Эти проблемы частично решались в процессе выполнения настоящего исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Дизайн исследования и общий расход материалов

Данное экспериментальное исследование включало в себя серию экспериментов *in vitro* и *in vivo*, согласно поставленным задачам.

Все этапы исследования in vitro проводились на базе ЦФПМБП ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, г. Москва, под руководством заведующего центра, д.м.н., профессора, академика РАЕН Борзенка С.А. Этапы исследований *in vitro* представлены в таблице 1.

На данном этапе проводилось выделение РПЭ от кроликов доноров-трупов, его культивирование с последующим конструированием 3D клеточных сфероидов. В ниже приведенных таблицах 2 и 3 представлены микрохирургический инструментарий, использованный для выделения РПЭ, а также перечень лабораторного оборудования, используемого при выполнении этапов работ *in vitro*.

Для иммуноцитохимического исследования отдельно формировали 2D (плоскостные) и 3D (объемные) культуры РПЭ. Оценивали экспрессию характерных эпителиальных маркеров, таких как: RPE-65 (высокоспецифичный маркер пигментного эпителия сетчатки), ZO-1 (белок запирающих межклеточных контактов), цитокератин 8, 18 (белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток), а также мезенхимального маркера виментина. Также на данном этапе оценивали морфологические особенности 2D и 3D культур, диаметр и форму полученных 3D сфероидов РПЭ, и их адгезивные способности. В нижеприведенной таблице 4 представлены реактивы, использованные на этапе исследования *in*

in vitro для культивирования и фенотипической идентификации клеточных культур РПЭ.

Помимо этого, была отработана методика проведения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) 3D сфероидов РПЭ и проведена оценка жизнеспособности полученных трехмерных клеточных культур после краткосрочной гипотермической консервации.

Таблица 1 – Дизайн исследования in vitro

Этапы и методы исследований	Описание	
1. Выделение кроличьего РПЭ	Кол-во доноров – 10 Кол-во глаз – 20	
2. 2D культивирование РПЭ	Состав питательной среды	
3. Иммуноцитохимическое исследование 2D культур РПЭ	Маркеры: RPE-65; ZO-1; цитокератин 8, 18; виментин	

1-я группа (опытная)	2-я группа (контрольная)
DMEM/F12 – 78%;	DMEM/F12 – 88%;
FBS – 20%;	FBS – 10%;
Глутамакс – 1%;	Глутамакс – 1%;
р-р антибиотиков – 1%.	р-р антибиотиков – 1%.
Количество полученных клеток – $8,71 \times 10^6$	Количество полученных клеток – $2,29 \times 10^6$

4. Конструирование 3D сфероидов РПЭ	Агарозные планшеты (3D Petri Dishes, Microtissue, США)
5. Иммуноцитохимическое исследование 3D культур РПЭ	Маркеры: RPE-65; ZO-1; цитокератин 8, 18; виментин
6. Исследование 3D сфероидов РПЭ на жизнеспособность	Маркер «Live and Dead» (Abcam, Великобритания)
7. Исследование морфо-функциональных свойств 3D сфероидов РПЭ	Фоторегистрация, измерение диаметра, оценка формы, изучение адгезивных свойств и способность к спредингу, СЭМ

Таблица 2 – Микрохирургический инструментарий для выделения РПЭ

Хирургический прием	Инструмент	Производитель
Удержание склеры	Пинцет склерально-шовный прямой OF-184	ООО «Титан серджикл», Россия
Удержание хориоидеи	Пинцет анатомический прямой OF-048	
Рассечение склеры и хориоидеи	Ножницы микрохирургические OS-062	
Удаление РПЭ с поверхности мембраны Бруха	Шпатель-скребок для фоторефракционной кератэктомии PRKOK-32	
Выкраивание корнео-склерального диска	Трепан 7,0 мм	Moria, Франция

Таблица 3 – Лабораторное оборудование

Оборудование	Производитель	Цель использования
Ламинарный бокс I класса безопасности Fotron L-F	Pokrok výrobné družstvo Žilina, Чехия	Стерильные манипуляции с глазными яблоками, первичное выделение клеточного и тканевого материала
Ламинарный бокс II класса безопасности MSC-Advantage	Scientific Technologies, Германия	Стерильные манипуляции с 2D и 3D клеточными культурами, с органными культурами
Центрифуга SL-40 R	Thermo Scientific, Германия	Центрифугирование
Инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп IX81 с интегрированной цифровой фотокамерой XC10	Olympus, Япония	Микроскопия и цифровая фотография
Сканирующий электронный микроскоп 6000plus	Jeol, Япония	
Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп «Fluo View FV10i»	Olympus, Япония	
Автоматический счетчик клеток Luna II	Logos biosystems, Корея	Измерение количества клеток
Одноканальный механический дозатор Biohit Proline переменного	Biohit, Финляндия	Дозировка жидкостей

объема дозирования 2-200 мкл		
Одноканальная пипетка переменного объема Ленпипет Дигитал 100-1000 мкл	Термо Фишер Сайентифик, Россия	
Инкубатор NU-5510	NuAire, США	Инкубирование клеточных культур

Таблица 4 – Реактивы для работы с клеточными культурами

Метод	Реактив	Производитель
Нормотермическое клеточное и органное культивирование	Эмбриональная телячья сыворотка (FBS)	HyClone, ThermoScientific, США
	Смесь антибиотиков (пенициллин 10000 МЕ/мл, стрептомицин 10000 мкг/мл, амфотерицин В 25 мкг/мл)	MP Biomedicals, LLC, США
	Полная ростовая среда Игла в модификации Дульбекко и среда Хэма F12 в соотношении 1:1 по объему (DMEM/F12)	ПанЭко, Россия
	Глутамакс	Gibco, США

Диссоциация клеточных слоев	Раствор трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хэнкса	ПанЭко, Россия
	Раствор Версена	
Промывание клеток и тканей	Фосфатно-солевой буфер	
Оценка жизнеспособности клеток	Раствор Хэнкса сбалансированный	
Иммуноцитохимическое окрашивание	Первичные антитела к RPE-65	Абсам, Великобритания
	Первичные антитела к цитокератину 8, 18	
	Первичные антитела к ZO-1	
	Первичные антитела к виментину	

*Все этапы исследований серии *in vivo** проводились на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заместителя директора по научной работе, к.м.н. Трифаненковой И.Г., и при непосредственном участии заведующего операционным блоком, к.м.н. Плахотного М.А. и заведующей диагностическим отделением №2, к.м.н. Ерохиной Е.В.

В данной серии экспериментов проводили оперативное вмешательство кроликам (n=30) по разработанной методике, описанной в разделе 4.1. Животные были разделены на 3 равные группы – 2 опытные и 1 контрольную. Кроликам из 1-й опытной группы субретинально вводили 81 сфероид, из 2-й опытной группы – 162 сфероида. Животным из контрольной группы

субретинально инъецировали 50 мкл физиологического раствора. Для послеоперационного контроля всем экспериментальным животным после оперативного вмешательства проводилась биомикроскопия, офтальмоскопия, фоторегистрация глазного дна, УЗ В-сканирование внутриглазных оболочек, ЭРГ и ОКТ сетчатки. В нижеприведенных таблицах 5 и 6 представлены оборудование и расходные материалы, использованные для оперативного вмешательства, а также методы для послеоперационного наблюдения за кроликами и сроки наблюдения. Далее животные выводились из эксперимента, глазные яблоки энуклеировались для последующего гистологического исследования, проводившегося на базе Лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заведующей лабораторией, к.м.н. Шацких А.В.

Таблица 5 – Дизайн исследования in vivo

Этапы и методы исследований	1-я опытная группа (81 сфероид)	2-я опытная группа (162 сфероида)	Контрольная группа (50 мкл физ. р-ра)	Сроки наблюдения
1. Биомикроскопия	n=10	n=10	n=10	1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60, 90 сутки
2. Офтальмоскопия	n=10	n=10	n=10	1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60, 90 сутки
3. Фоторегистрация переднего отрезка глаза и глазного дна	n=10	n=10	n=10	1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60, 90 сутки

4. УЗ В-сканирование внутриглазных оболочек	n=10	n=10	n=10	1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60, 90 сутки
5. ОКТ сетчатки	n=10	n=10	n=10	1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60, 90 сутки
6. ЭРГ	n=10	n=10	n=10	1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60, 90 сутки
7. Гистологическое исследование	n=10	n=10	n=10	1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60, 90 сутки

Таблица 6 – Хирургическое оборудование и расходные материалы,
использованные для трансплантации 3D сфероидов РПЭ

Оборудование и расходные материалы	Производитель
Витреоретинальная система Accurus	Alcon, США
Троакарный набор 25G (3 установленных в порты стилета, 3 порта с клапанами, 1 инфузионная канюля)	
Прямой эндоосветитель 25G	
Витреотом 25G	
Витрэктомическая линза HR Direct 20° Prism	Volk, США
Шприц с адаптером для субретинальной инъекции MicroDose Injection Kit 1ml	MedOne, США
Канюля для субретинальной инъекции Poly Trip (калибр канюли 25G, длина канюли 28мм, калибр	RUMEX International, США

наконечника 39G, длина наконечника 5 мм)	
Шовный материал Викрил 8-0	Ethicon, США

2.2 Методы культивирования и исследования ретинального пигментного эпителия in vitro

2.2.1 Выделение кроличьего ретинального пигментного эпителия, особенности культивирования

Для выделения РПЭ было использовано 20 глазных яблок от 10 доноров-кроликов, энуклеированных и помещенных в условия гипотермии в течение 4 часов. Использовалась частично модифицированная техника препарирования, предложенная Борзенком С.А. и Поповым И.А. с соавторами (патент РФ на изобретение № 2569481 от 25.12.2014 «Способ получения культуры клеток ретинального пигментного эпителия из глаза взрослого донора-трупа»). Манипуляции с донорскими глазными яблоками и первичное выделение клеточного и тканевого материала проводились в ламинарном боксе Fotron L-F (Pokrok výrobné družstvo Žilina, Чехия).

Описание техники выделения РПЭ

Вакуумным трепаном диаметром 7,0 мм (Mogia, Франция) выкраивали корнео-склеральный диск и удаляли из операционного поля. Далее рассекали склеру тремя меридиональными разрезами спереди назад длиной 2/3 от длины глазного яблока, параллельными переднезадней оси глаза через равные промежутки с получением трех лепестков склеры. Лепестки склеры поочередно отгибали и со стороны супрахориоидеи пересекали вортикозные вены и внутрисклеральную часть зрительного нерва. Затем склеру удаляли из операционного поля. Далее наносили три разреза на ХПК – первый круговой разрез – на расстоянии 1 мм от зубчатой линии, один меридиональный разрез

– в любом меридиане в направлении от первого разреза спереди назад к культе ДЗН, и второй круговой разрез – на расстоянии 1 мм от культы зрительного нерва. Далее ХПК аккуратно отделяли от нейросенсорной сетчатки пинцетом и укладывали на дно стерильной чашки Петри в положении «клетками РПЭ вверх», заливали 2 мл смеси раствора 0,25% трипсина-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и раствора Версена в соотношении 1:1 по объему, инкубировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в течение 20 минут. В данной работе все этапы инкубирования 2D и 3D клеточных культур проводили в инкубаторе NU-5510 (NuAire, США). По окончании инкубации в чашку Петри для нейтрализации ферментативной смеси добавляли 1 мл эмбриональной телячей сыворотки (*англ.* fetal bovine serum, FBS) и отделяли клетки РПЭ от мембраны Бруха гидродинамически многократным промыванием струей стерильного фосфатно-солевого буфера (*англ.* phosphate buffered saline, PBS) под напором из шприца. Полученную суспензию клеток РПЭ переносили в центрифужную пробирку 10 мл. Далее суспензию клеток РПЭ объемом 200 мкл переносили в чашку Петри (35 мл) и исследовали с помощью инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа IX81 с интегрированной цифровой фотокамерой XC10 (Olympus, Япония) при увеличении x100 – качественно оценивали степень чистоты суспензии клеток.



Рисунок 1 – Инкубатор NU-5510 (NuAire, США)

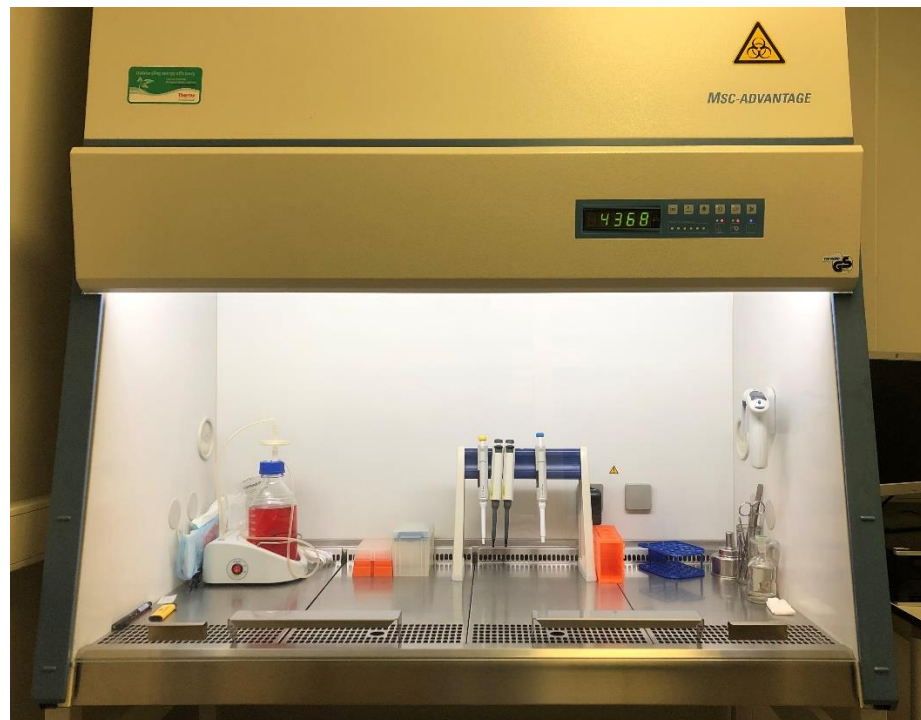


Рисунок 2 – Ламинарный бокс II класса безопасности MSC-Advantage (Scientific Technologies, Германия)

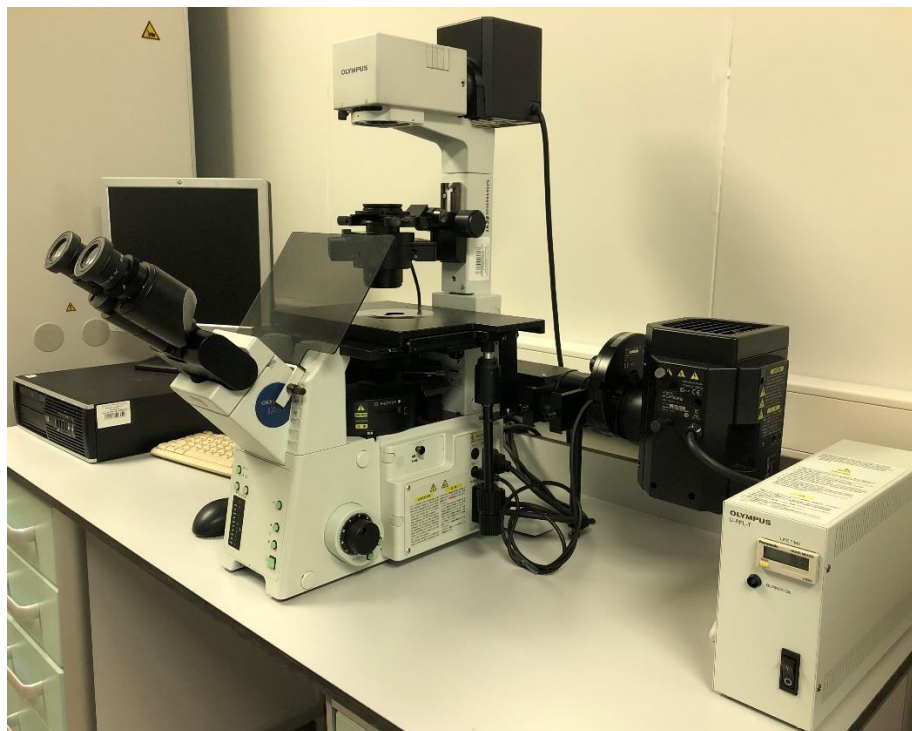


Рисунок 3 – Инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп IX81с интегрированной цифровой фотокамерой XC10 (Olympus, Япония)

Протокол и особенности культивирования РПЭ

Для 3D культивирования клеток традиционно первым этапом проводится 2D культивирование, что способствует получению достаточного количества клеточного материала, а также позволяет оценить свойства, жизнеспособность и фенотип полученных культур. В данной работе все манипуляции с 2D и 3D клеточными культурами проводили в ламинарном боксе II класса безопасности MSC-Advantage (Scientific Technologies, Германия).

Для 2D культивирования использовали 20 суспензий клеток РПЭ, полученных от 10 доноров. Каждую полученную суспензию центрифугировали в режиме 1100 об./мин. в течение 5 минут (центрифуга SL-40 R, Thermo Scientific, Германия). Затем удаляли надосадочную жидкость и полученный осадок разбавляли 5 мл питательной среды.



Рисунок 4 – Центрифуга SL-40 R (Thermo Scientific, Германия)

Полученные 2D культуры разделяли на 2 равные группы – опытную и контрольную [15], в зависимости от процентного содержания в объеме питательной среды факторов роста клеток, с целью определения возможности ускорения митоза клеток РПЭ.

Состав питательной среды:

1. Эмбриональная телячья сыворотка (*англ.* fetal bovine serum, FBS, HyClone, США) – естественный источник фактора роста и адгезии клеток – 20% (1-я группа – опытная) и 10% (2-я группа – контрольная) объема. По данным литературы, повышенное содержание FBS в питательной среде способствует клеточной пролиферации и не препятствует митозу, однако может способствовать трансформации эпителиальных клеток в мезенхимальные [98].

2. Ростовая среда Игла в модификации Дульбекко и среды Хэма (DMEM/F12, Sigma, США) в соотношении 1:1 по объему – 78% (1-я группа – опытная) и 88% (2-я группа – контрольная) объема. Применяется для

выращивания широкого спектра клеточных культур. Содержит витамины, соли и аминокислоты.

3. Глутамакс (Gibco, США) – биологическая добавка для нормализации обмена веществ – 1% объема. Уменьшает цитотоксическое действие лимфоцитов и обладает антиоксидантным действием. Содержит витамины, аминокислоты и микроэлементы.

4. Раствор антибиотиков: пенициллин, стрептомицин – аминогликозид, амфотерицин В – противогрибковый (ПанЭко, Россия) – 1% объема.

Таблица 7 – Состав питательных сред для культивирования РПЭ

Компонент	1 группа	2 группа
DMEM/F12	78%	88%
FBS	20%	10%
Глутамакс	1%	1%
Раствор антибиотиков	1%	1%

Далее осуществляли забор 10 мкл жидкости с культурой РПЭ и проводили подсчет клеток при помощи автоматического счетчика клеток Luna II (Logos biosystems, Корея).



Рисунок 5 – Автоматический счетчик клеток Luna II
(Logos biosystems, Корея)

Затем суспензии клеток РПЭ, находящиеся в питательной среде, переносили из пробирок в культуральные матрасы с площадью ростовой поверхности 25 см² (Techno Plastic Products, Швейцария) и инкубировали при стандартных условиях. Первую смену питательной среды проводили спустя 5-7 дней (в зависимости от адгезии большего количества клеток), далее – каждые 2-3 дня. Таким образом, получали первичную клеточную культуру, т.е. нулевого пассажа – P0.

По достижению 80%-й конфлюэнтности клеточного слоя в каждом культуральном матрасе 1-й и 2-й групп питательную среду аспирировали и клетки РПЭ ферментативно дезагрегировали раствором 0,25% трипсина-ЭДТА в течение 5 минут. Далее к суспензии клеток добавляли 1 мл питательной среды, клетки переносили в пробирку объемом 10 мл и центрифугировали в течение 5 минут (1100 об./мин.). Затем из пробирки удаляли надосадочную жидкость, клетки разбавляли 3 мл питательной среды.

Полученную смесь рассаживали на 3 культуральных матраса, в каждый матрас добавляли 4 мл питательной среды, таким образом получали культуру клеток РПЭ 1-го пассажа – Р1.

Полученные культуры использовали для проведения иммуноцитохимического исследования с последующим трехмерным клеточным культивированием. Также для оценки качественных и количественных характеристик 2D культур РПЭ опытной и контрольной групп проводили фоторегистрацию и подсчет клеток.

2.2.2 Иммуноцитохимическое исследование 2D культур ретинального пигментного эпителия

Для молекулярной идентификации клетки 2D культур пассажа Р1 1-й опытной и 2-й контрольной групп подвергали иммуноцитохимическому исследованию для выявления ряда специфических белковых маркеров:

RPE-65 – высокоспецифичный фермент пигментного эпителия сетчатки, один из ключевых белков зрительного цикла. Преимущественно располагается в мембране гладкого эндоплазматического ретикулама.

ZO-1 (лат. zonula occludens) – это семейство белков, входящих в состав плотных запирающих межклеточных контактов в составе которых мембраны соседних клеток максимально сближены и «сшиты» специализированными белками. Роль плотных контактов заключается в том, чтобы ограничивать и регулировать параклеточную диффузию – они предотвращают протекание тканевой жидкости через эпителий, но при необходимости могут быть проницаемыми для ионов, небольших гидрофильных молекул и даже макромолекул. Всего в состав плотных контактов входит около 40 различных белков, как мембранных, так и цитоплазматических. Наиболее изученным является белок ZO-1. ZO-1 – типичный белок для клеток РПЭ.

Цитокератины – это белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток. В настоящее время выявлено 20 типов цитокератинов. Спектр цитокератинов в эпителиальных клетках зависит от типа дифференцировки и положения клетки в эпителиальном пласте. В клетках простого однослойного эпителия экспрессируется цитокератин 8 и цитокератин 18.

Виментин – белок промежуточных филаментов III типа, основной компонент мезенхимальных клеток. Увеличение экспрессии Виментина является признаком ЭМТ в клеточной культуре.

Методика проведения иммуноцитохимического исследования

После ферментативного дезагрегирования клетки РПЭ Р1 переносили на адгезивные стекла в расчете 10 тыс. клеток на одно стекло и культивировали при стандартных инкубационных условиях в течение 3 дней до 80% конфлуэнтности. Далее клетки 3 раза отмывали в растворе PBS, фиксировали в 4% растворе формалина в течение 20 минут при $t=4^{\circ}\text{C}$ и вновь 3-хкратно отмывали в PBS. Фиксированные клетки 2D культуры РПЭ инкубировали с первичными моноклональными антителами в соответствующих разведениях при комнатной температуре в течение 1 часа.

Таблица 8 – Антитела, использованные для иммуноцитохимического окрашивания

Антитело	Производитель	Использованное разведение
RPE-65	Abcam, Великобритания	1:100
ZO-1	Abcam, Великобритания	1:100
Цитокератин 8,18	Abcam, Великобритания	1:100
Виментин	Abcam, Великобритания	1:250

Далее клетки 3-х кратно отмывали в PBS и наносили видоспецифичные вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами AlexaFluor 488 и 594 в разведении 1:250 (Abcam, Великобритания), после чего инкубировали 1 час при комнатной температуре. Затем стекла с клетками трижды отмывали в PBS, ядра докрашивали флуоресцентным красителем бис-бензимида – Hoechst 33258 (ПанЭко, Россия). Полученные препараты заключали под покровное стекло и анализировали в видимом и ультрафиолетовом световых диапазонах под лазерным конфокальным сканирующим микроскопом «Fluoview FV10I» (Olympus, Япония).

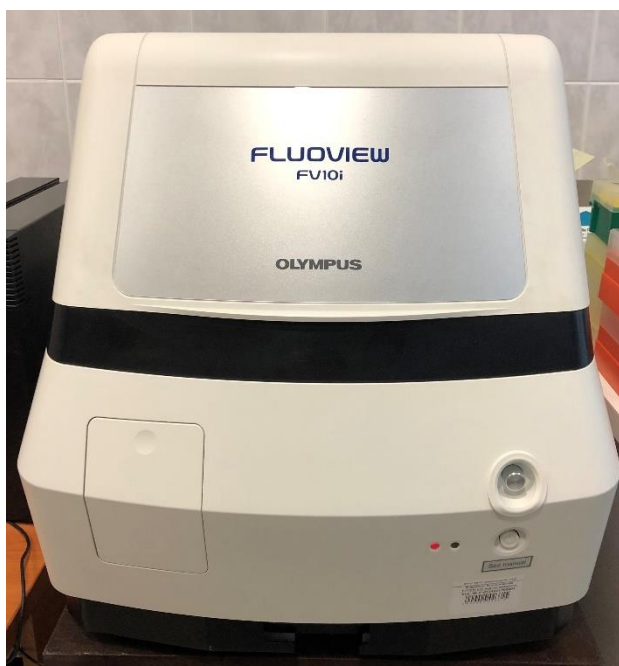


Рисунок 6 – Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Fluoview FV10i (Olympus, Япония)

2.2.3 Подготовка ретинального пигментного эпителия к трансплантации методом трехмерного клеточного культивирования

Из полученной и охарактеризованной 2D культуры клеток РПЭ создавали 3D клеточные сфероиды. В данной работе использовали метод получения сфероидов РПЭ посредством неадгезивных 81-луночных планшетов (3D Petri Dishes, Microtissue, США), отличающийся от других наибольшей простотой и воспроизводимостью. Данный метод позволяет получать сфероиды в каждой лунке планшета из заданного количества клеток и способствует образованию плотных межклеточных связей между клетками в сфероиде.

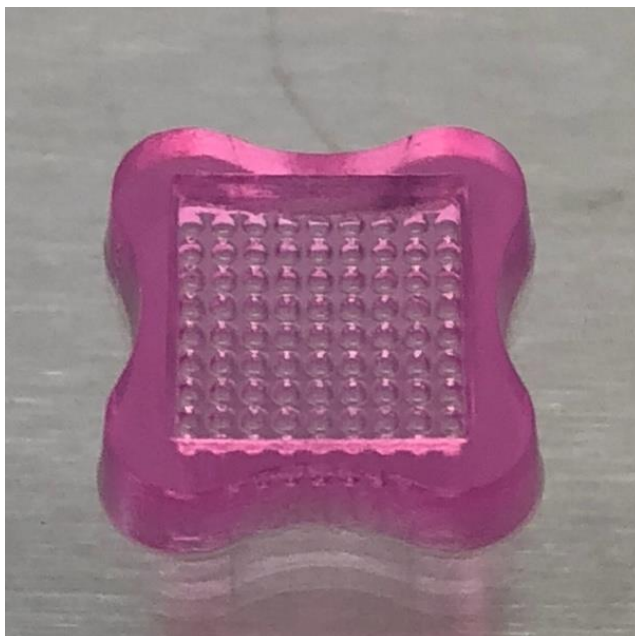


Рисунок 7 – 81-луночный агарозный планшет (Microtissue, США)

Клеточные 2D культуры P1 с конфлуэнтным монослоем переводили в 3D культуру. В данной работе для создания 3D сфероидов использовали клетки РПЭ 1-го пассажа, так как по данным литературы по мере увеличения пассирования в культуре может увеличиваться преобладание клеток мезенхимального фенотипа [15].

Методика конструирования 3D клеточных сфероидов РПЭ

Питательную среда 2D культур аспирировали из культуральных матрасов и клетки РПЭ ферментативно дезагрегировали 1 мл раствора трипсина-ЭДТА 0,25% в течение 5 минут при стандартных инкубационных условиях. Далее к суспензии клеток добавляли 1 мл питательной среды, клетки переносили в пробирку объемом 10 мл и центрифугировали в течение 5 минут (1100 об./мин.). Затем надосадочную жидкость удаляли и к суспензии клеток РПЭ добавляли 1 мл питательной среды стандартного состава. Образец суспензии объемом 5 мкл использовали для подсчета клеток с помощью автоматического счетчика клеток. Затем клетки РПЭ, находящиеся в питательной среде, переносили в агарозные планшеты из расчета 81000

клеток на 1 планшет. Таким образом, формировали сфероиды, каждый из которых содержал 1000 клеток. Количество клеток в сфероиде обусловлено данными, полученными авторами в предыдущих исследованиях – сфероиды, состоящие из 1000 клеток быстрее адгезируются к плоской поверхности и имеют диаметр около 100 мкм, что необходимо для того, чтобы субретинально инъецировать клеточные трансплантаты через канюли минимального диаметра. Также, такая концентрация клеток является оптимальной для свободной диффузии питательных веществ в 3D культуре и позволяет избежать центрального некроза, характерного при формировании более крупных сфероидов. Меньшее количество клеток в сфероиде нежелательно ввиду риска недостаточного терапевтического эффекта [15, 19].

2.2.4 Оценка морфо-функциональных характеристик 3D сфероидов ретиального пигментного эпителия

За динамикой формирования сфероидов внутри лунок агарозного планшета следили ежедневно в течение 30-и дней, также проводили фоторегистрацию полученных клеточных культур и давали качественную оценку наблюдаемым явлениям. Кроме того, на указанных сроках фиксировали изменение диаметра формирующихся микроагрегатов.

После переноса суспензии клеток РПЭ в агарозные планшеты клеточные культуры фотографировали через 3 часа, на 1-й день и ежедневно в течение 30 дней с помощью инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа. Также, с 1-го по 30-й день ежедневно проводили измерение диаметра сфероидов и оценивали их форму. Смену питательной среды проводили каждые 2-3 дня.

3D сфероиды РПЭ 4-х, 7-и и 11-и суток культивирования переносили из агарозных планшетов на чашки Петри (35 мм) и заливали 2 мл питательной

среды. На данном этапе оценивали адгезивные свойства клеточных трансплантатов и их способность к спредингу.

Полученные 3D сфероиды РПЭ также подвергались иммуноцитохимическому анализу и тестам на жизнеспособность, в том числе и после краткосрочной гипотермической консервации.

Для определения клеточного фенотипа 3D сфероидов РПЭ проводили иммуноцитохимическое исследование на 4-е, 7-е и 11-е сутки культивирования. Для этого отдельно формировали сфероиды в количестве 600-700 штук.

Полученные сфероиды 3-хкратно отмывали в растворе PBS, после чего производили фиксацию в 4%-м растворе параформальдегида в течение 20-ти мин при 4°C, затем вновь трижды отмывали в PBS. Фиксированные клетки 3D культуры инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с первичными антителами к маркерам RPE-65 (1:100), ZO-1 (1:100), цитокератину 8,18 (1:100) и виментину (1:250) с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами AlexaFluor 488, 594 в разведении 1:250. Полученные сфероиды переносили в специально предназначенную чашку Петри с округлым углублением в центре и анализировали в видимом и ультрафиолетовом световых диапазонах под конфокальным лазерным сканирующим микроскопом. Преимуществом данного метода микроскопии является возможность получения изображения с очень тонкого слоя объекта, т.е. «оптического среза» (slice). На основе серии оптических срезов проводили объемную реконструкцию объекта и получали его трехмерное изображение, не используя при этом трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов.

Для оценки жизнеспособности полученных клеточных культур на аналогичных сроках наблюдения использовали флуоресцентный краситель «Live and Dead» (Abcam, Великобритания). Данный краситель представляет

собой коммерческий набор, содержащий в своем составе два флуоресцентных красителя – живые клетки окрашиваются в зеленый цвет, мертвые клетки окрашиваются в красный цвет. В данном исследовании использовали клеточные культуры 4-х, 7-х и 11-х суток культивирования. Полученные трансплантаты помещали в пробирки, центрифугировали (1100 об./мин., 5 мин), удаляли надосадочную жидкость и добавляли 1 мл раствора PBS. Далее повторно центрифугировали (1100 об./мин., 5 мин), полученный осадок ресуспензировали в 100 мкл раствора PBS с 1х концентрацией раствора «Live and Dead» и инкубировали при комнатной температуре 10 минут в темноте. Анализ осуществляли с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа. Кроме того, в связи с необходимостью транспортировки сконструированных клеточных трансплантатов из культуральных лабораторий в операционные блоки, в данном случае из Головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в Калужский филиал, 3D сфероиды РПЭ исследовали на выживаемость после краткосрочной гипотермической консервации (разд. 3.6).

Также на данном этапе изучали адгезивные способности сфероидов и их способность к спредингу после нормотермического культивирования и после краткосрочной гипотермической консервации. Для этого трехмерные клеточные культуры 4-х, 7-х и 11-х суток культивирования переносили из агарозных планшетов на культуральные матрасы и заливали 5 мл питательной среды. Сфероиды ежедневно оценивали с помощью инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа в течение 14 дней, а также измеряли площадь слоя РПЭ, образуемого в процессе спрединга.

2.2.5 Сканирующая электронная микроскопия

3D сфероиды РПЭ (4-е, 7-е и 11-е сутки культивирования) после краткосрочной гипотермической консервации (1-я опытная группа, n=40) и нормотермического культивирования (2-я контрольная группа, n=40)

оценивали с помощью СЭМ (сканирующий электронный микроскоп 6000plus, Jeol, Япония) с целью определения формы и диаметра, согласно Протоколу сканирующего электронно-микроскопического исследования:

1. Фиксирование 3D сфероидов РПЭ в 10% р-ре формалина в течение 1 часа при $t=+4^{\circ}$ С.

2. Осаждение клеточных культур центрифугированием, удаление надосадочной жидкости.

3. Трехкратное промывание трансплантатов в 100 мкл р-ра PBS в течение 5 мин.

4. Обезвоживание 3D сфероидов РПЭ в ацетоне восходящей концентрации: 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% и 100% (трехкратно). В каждом из растворов объекты выдерживали по 15 минут и далее центрифугировали с последующей сушкой в критической точке (Critical Point Dryer Quorum k850, Quorum Technologies, Великобритания).

5. Механическая фиксация 3D клеточных культур к предметному столику с помощью карбонового скотча.

6. Напыление золотом (проба 999, толщина слоя 5 нм) в вакуумной напылительной установке для обеспечения электронно-проводящего слоя на поверхности образцов (Smart Coater SPI, SPI Supplies, США).

7. СЭМ 3D сфероидов РПЭ при увеличении $\times 1000$ (мощность 10 kV).

8. Фоторегистрация полученных изображений 3D клеточных культур с последующей оценкой морфологических особенностей.



Рисунок 8 – Сканирующий электронный микроскоп 6000plus (Jeol, Япония)

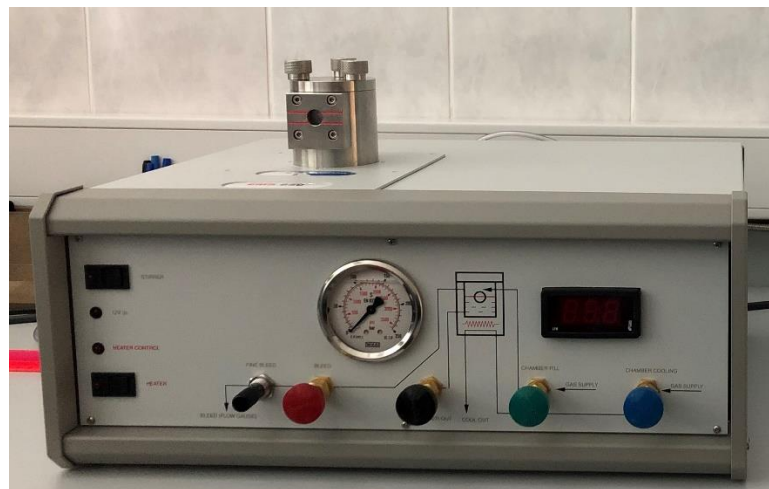


Рисунок 9 – Сушильная установка Quorum K850 (Quorum Technologies, Великобритания)



Рисунок 10 – Вакуумная напылительная установка Smart Coater SPI
(SPI Supplies, США)

2.2.6 Гистологическое исследование

Животные выводились из эксперимента на 1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60 и 90-е сутки после оперативного вмешательства под общим наркозом путем воздушной эмболии с соблюдением правил биоэтики, утвержденных приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1997, а также принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского общества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации о защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей. Глазные яблоки энуклеировались для последующих гистологических исследований.

Методика получения гистологических препаратов

После энуклеации глазные яблоки кроликов промывали проточной водой и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, предварительно вводя интравитреально через pars plana 5% раствор формалина до достижения офтальмогипертензии. Энуклеированные глазные

яблоки подвергали стандартной обработке с обезвоживанием и обезжириванием в спиртах восходящей концентрации (70°, 80°, 90°, 96°, 100°) и заливали в парафин. Далее выполняли серии гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозином. Препараты изучали с помощью инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа с интегрированной цифровой фотокамерой при x50, x100, x200, x400 - кратном увеличении с последующим фотографированием. По гистологическим препаратам срезов глазных яблок оценивали морфологическое состояние внутриглазных структур с помощью световой микроскопии под разными увеличениями.

2.3 Экспериментально-клинические методы трансплантации и исследования ретинального пигментного эпителия *in vivo*

2.3.1 Хирургическая техника трансплантации ретинального пигментного эпителия

Ближайшим аналогом к предложенной в данной работе хирургической технике субретинальной трансплантации РПЭ является способ, заключающийся в проведении кроликам микроинвазивной 25G витрэктомии через pars plana, ретинопунктуры в парацентральном отделе сетчатки и субретинальном введении стволовых клеток, меченных магнитными частицами после предварительного подшивания в заднем отрезку склеры магнитной пластины [9].

Преимуществами данного способа являются:

1. Пометка стволовых клеток магнитными частицами с одномоментным экстрасклеральным подшиванием магнитной пластины способствует снижению риска диссеминации трансплантируемых клеток.

2. Малый диаметр ретинопунктурного отверстия не требует проведения ЭЛК сетчатки.

3. После предложенного малоинвазивного вмешательства не требуется тампонировать витреальную полость СМ.

Недостатками данного способа являются:

1. Трудность в получении стволовых клеток, их культивировании с последующим насыщением магнитными частицами.

2. Двухэтапная хирургия – до трансплантации клеточных культур первым этапом требуется подшивание магнитной пластины к заднему отрезку склеры.

3. Формирование под сетчаткой неоднородного слоя клеток и диссеминация клеток в витреальную полость.

4. Риск трансформации стволовых клеток в раковые.

Учитывая вышеуказанные преимущества и недостатки ранее предложенной хирургической техники, в данной диссертационной работе была разработана модифицированная хирургическая методика, заключающаяся в проведении кроликам микроинвазивной 25G витрэктомии через pars plana, ретинопунктуры и субретинальном введении РПЭ в форме 3D сфероидов с последующей тампонадой витреальной полости стерильным воздухом. Подробное описание предложенной техники представлено в разд. 4.1.

2.3.2 Морфо-функциональные методы исследования глазных яблок кроликов

Для оценки состояния внутриглазных структур до оперативного вмешательства и в динамике на 1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60 и 90-е сутки наблюдения после трансплантации 3D сфероидов РПЭ всем

экспериментальным животным проводили стандартное и специализированное офтальмологическое обследование, а именно:

- 1. Биомикроскопия** (ручная щелевая лампа «Heine», Германия);
- 2. Офтальмоскопия** (бинокулярный офтальмоскоп Скепенса «Heine», Германия);
- 3. Фоторегистрация переднего отрезка глаза и глазного дна** (диагностическая ретинальная система «RetCam-120», США);
- 4. ЭРГ** (электрофизиологический комплекс EP-1000 Pro, Tomey, Япония). Всем кроликам выполняли регистрацию электроретинограмм после расширения зрачка 1% раствором мидриацила и анестезии роговицы 1% раствором проксиметакаина. Интенсивность вспышек составляла 2cd/m^2 . С помощью активного электрода (серебряный электрод-петля) регистрировали максимальную ЭРГ на одиночные стимулы белого света. Игольчатые электроды (референтный и земляной) располагались подкожно в области лба кроликов. Исследование проводили после предварительной десятиминутной темновой адаптации. Амлитудно-временные характеристики ЭРГ оценивали после усреднений 10 предъявлений сигнала. Усредненную ЭРГ выводили на экран монитора и с помощью движущихся маркеров измеряли амплитуду и латентность волн “а” и “b” максимальной ЭРГ.
- 5. УЗ В-сканирование** внутриглазных оболочек (УЗ А/В сканер и биометр UD-6000, разрешение 15 мкм, Tomey, Япония);
- 6. ОКТ** проводилась с помощью прибора Askin Spectralis («Heidelberg engineering», Германия) для оценки архитектоники слоев сетчатки и её толщины.

2.4 Статистические методы исследования

Статистическую обработку полученных в ходе эксперимента данных осуществляли на персональном компьютере с программным обеспечением Statistica 10. Для оценки полученных данных использовали методы параметрической описательной статистики с определением средней арифметической величины (M) и стандартного отклонения ($\pm\sigma$). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента: в случаях сопоставления разных исследуемых групп – для независимых выборок; в случае оценки динамики исследуемых показателей в одной группе или оценки различий – для зависимых выборок. Различия сравниваемых показателей принимали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ С ПОСЛЕДУЮЩИМ КОНСТРУИРОВАНИЕМ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Для разработки метода конструирования трансплантатов 3D клеточных сфероидов из РПЭ, согласно 1-й задаче диссертационного исследования, проводили серию экспериментов *in vitro*. На данном этапе выделяли РПЭ из кадаверных кроличьих глаз и проводили его первичное 2D культивирование с последующим иммуноцитохимическим исследованием для подтверждения клеточного фенотипа полученных культур. При получении достаточного количества клеток РПЭ 2D культуры переводили в трехмерные (3D), используя неадгезивные агарозные планшеты – таким образом формируя 3D клеточные сфероиды РПЭ. Далее оценивали морфо-функциональные характеристики полученных 3D сфероидов РПЭ, такие как: изменение формы и диаметра в динамике, а также способность к адгезии и спредингу. Для подтверждения клеточного фенотипа полученных 3D культур РПЭ проводили иммуноцитохимические исследования, а также тесты на жизнеспособность после нормотермического культивирования и после краткосрочной гипотермической консервации. Также на данном этапе была разработана методика проведения СЭМ 3D сфероидов РПЭ.

3.1 Результаты выделения и первичного 2D культивирования ретинального пигментного эпителия

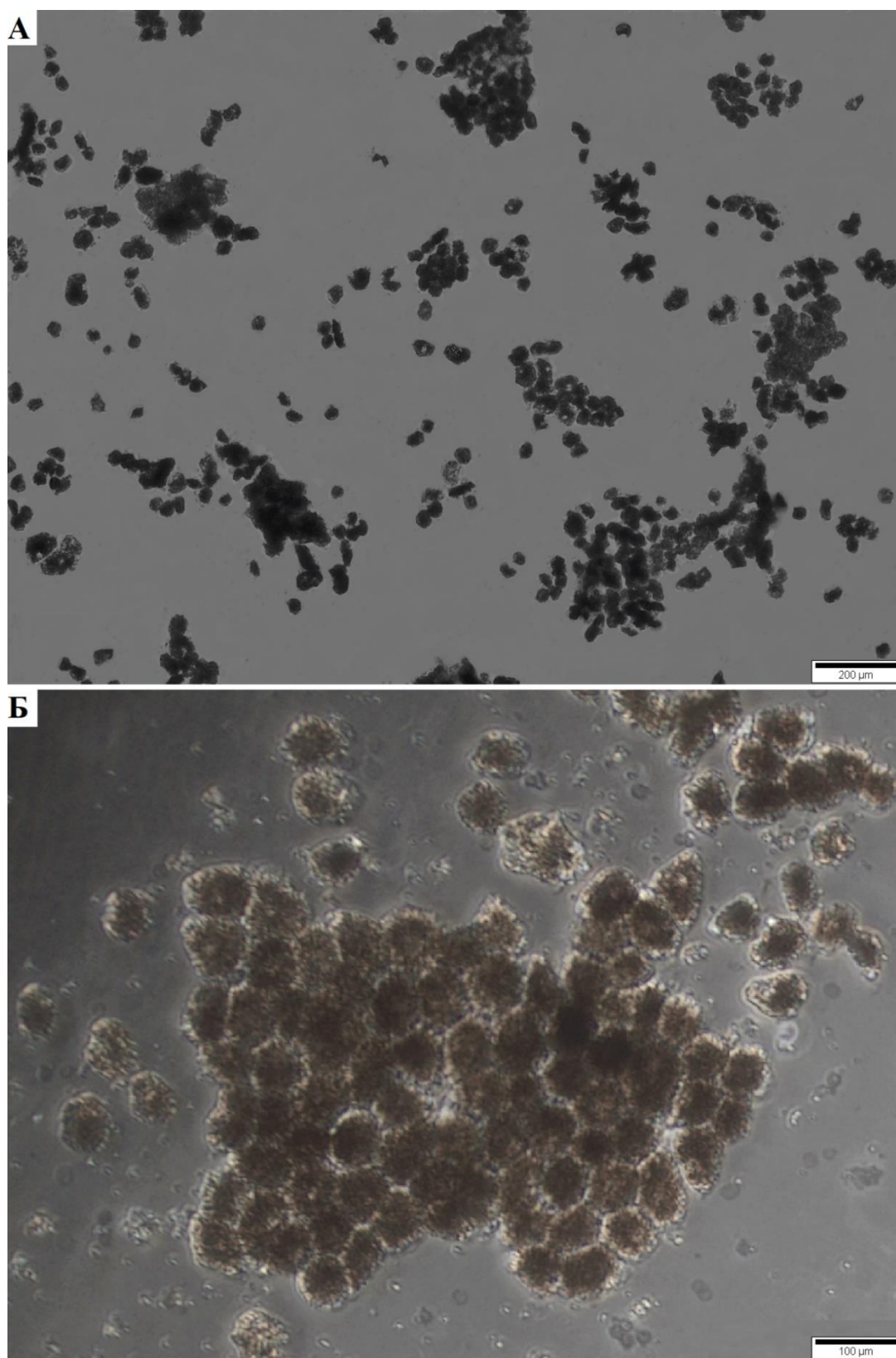
При первичном выделении РПЭ из кадаверных кроличьих глаз иридо-хрусталиково-цилио-витрео-ретинальный комплекс (ИХЦВРК) во всех 20-ти образцах оставался нетронутым, сетчатка не повреждалась, витреальная полость оставалась невскрытой.

При проведении световой микроскопии первично выделенных клеток РПЭ оценивали чистоту полученных суспензий. Во всех образцах попадание в культуру клеток РПЭ фрагментов сетчатки и волокон стекловидного тела также было минимально. Это свидетельствует о том, что частично модифицированная ранее разработанная методика выделения РПЭ на трупных глазах человека применима к кроличьим глазам.

Полученные культуры клеток 1-й опытной (повышенное содержание в питательной среде ростовых факторов) и 2-й контрольной (стандартный состав питательной среды) групп в условиях 2D культивирования формировали монослой и имели характерную гексагональную форму с большим количеством пигмента. Уже на 1-е сутки в обеих группах отмечали адгезию большинства клеток РПЭ к дну культурального матраса.

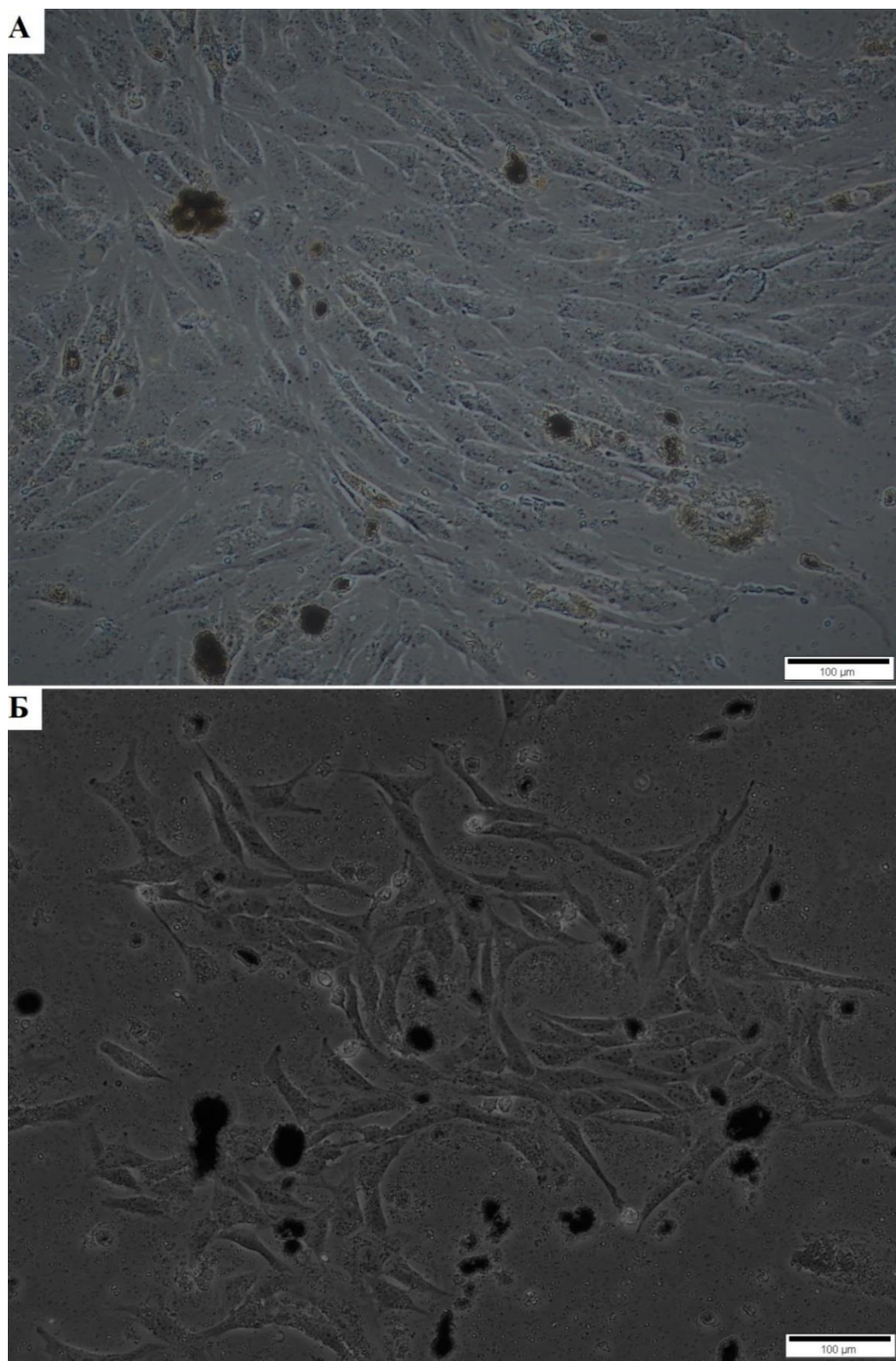
В последующие дни ежедневно отмечали увеличение количества клеток РПЭ, однако в 1-й опытной группе визуально отмечали значительно большее количество клеток. В обеих группах образцы клеток по-прежнему сохраняли гексагональную форму и значительное количество пигмента.

На 5 – 7-й день в каждом из 10 образцов 1-й опытной группы был получен монослой клеток с 80% конfluэнтностью. Далее все клетки 1-й опытной и 2-й контрольной групп ферментативно дезагрегировали для проведения сравнительного количественного анализа. Было выявлено, что в 1-й опытной группе количество клеток РПЭ достоверно значительно превышает количество клеток во 2-й контрольной группе. Таким образом, было установлено, что удвоенное количество ростовых факторов в питательной среде достоверно способствует увеличению количества клеток РПЭ за значительно более короткий промежуток времени. В таблице 9 представлено количество клеток РПЭ, полученных в 1-й опытной и 2-й контрольной группах спустя 1 неделю после выделения и начала культивирования. Количество клеток РПЭ было статистически значимо больше в 1-й опытной группе ($p < 0,05$).



а – ув. х 50; б – ув. х 100

Рисунок 11 – Первично выделенная культура РПЭ, фазово-контрастная микроскопия



а – опытная группа; б – контрольная группа

Рисунок 12 – Первичная 2D культура РПЭ, 3-и сутки культивирования, фазово-контрастная микроскопия, ув. х 100

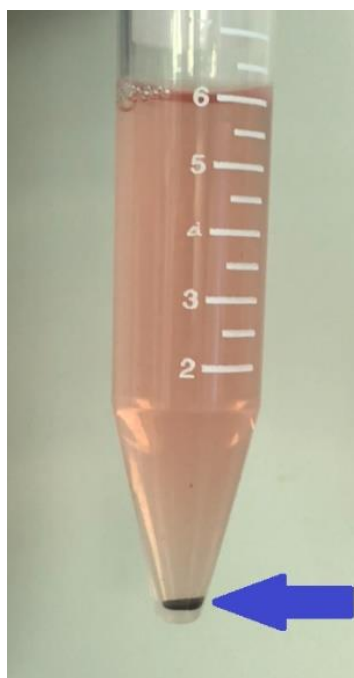


Рисунок 13 – Первично выделенная культура РПЭ в пробирке с питательной средой после центрифугирования. Осадок клеток РПЭ отмечен стрелкой

После ферментативной дезагрегации и подсчета клеток каждый образец 1-й опытной группы пересеивали на три культуральных матраса, таким образом получали культуру РПЭ 1-го пассажа – P1.

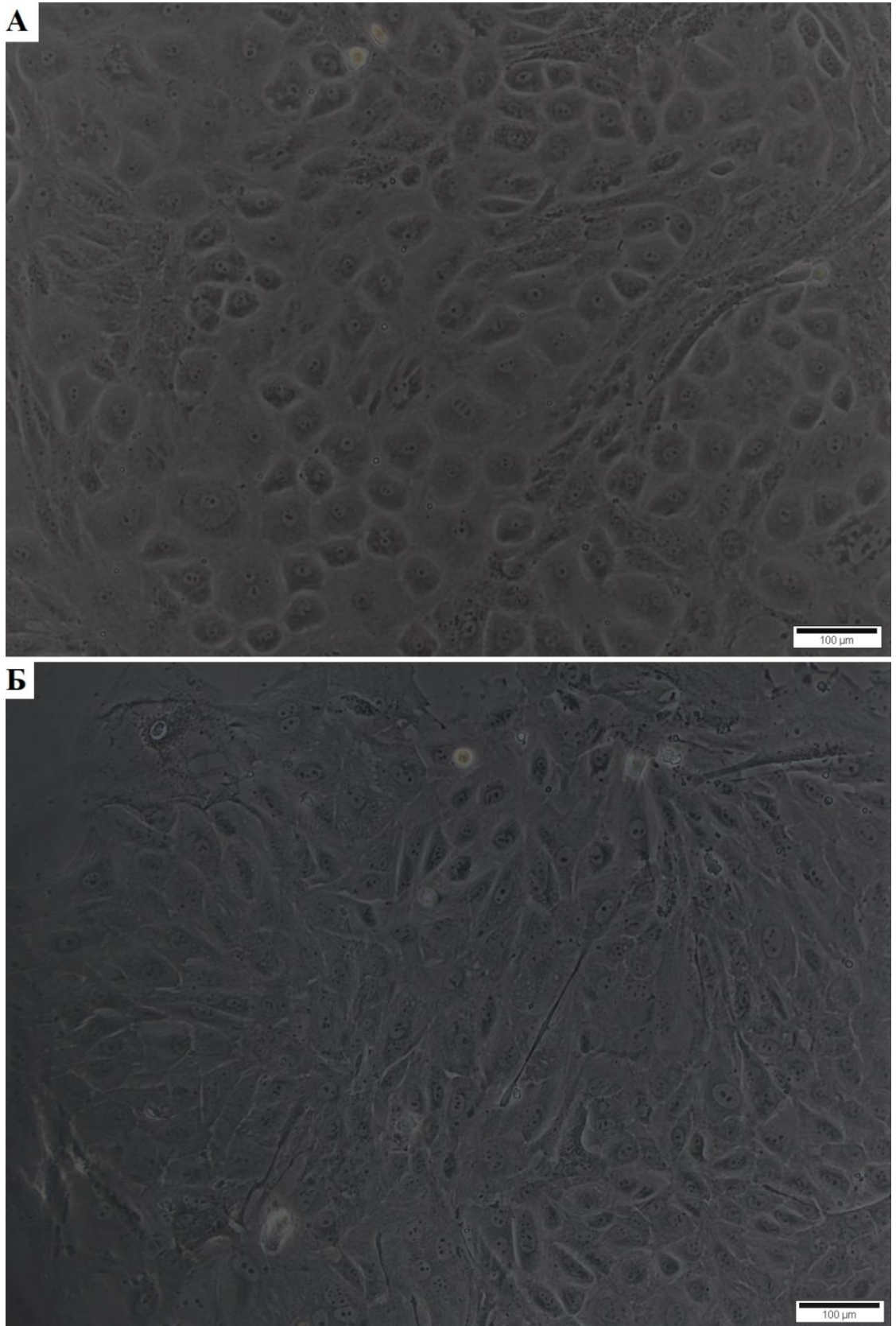
Клетки 2-й опытной группы продолжали культивировать. 80%-я конфлуэнтность была достигнута в течение 3-4 недель. Далее каждый образец также пересеивали на три культуральных матраса для получения P1.

Клетки РПЭ P1 также имели полигональную форму, отмечали уменьшение количества пигмента.

После получения достаточного количества клеток РПЭ P1 в обеих группах проводили иммуноцитохимическое исследование для фенотипической идентификации полученных культур.

Таблица 9 – Количество клеток РПЭ, полученных через 1 неделю после выделения и культивирования

Опытная группа	
Образец №	Количество полученных клеток
1	$9,51 \times 10^5$
2	$9,02 \times 10^5$
3	$8,78 \times 10^5$
4	$9,11 \times 10^5$
5	$8,92 \times 10^5$
6	$7,97 \times 10^5$
7	$8,19 \times 10^5$
8	$8,32 \times 10^5$
9	$9,46 \times 10^5$
10	$7,83 \times 10^5$
Контрольная группа	
1	$1,83 \times 10^5$
2	$2,13 \times 10^5$
3	$2,02 \times 10^5$
4	$1,95 \times 10^5$
5	$3,01 \times 10^5$
6	$2,51 \times 10^5$
7	$1,88 \times 10^5$
8	$3,12 \times 10^5$
9	$2,52 \times 10^5$
10	$1,92 \times 10^5$

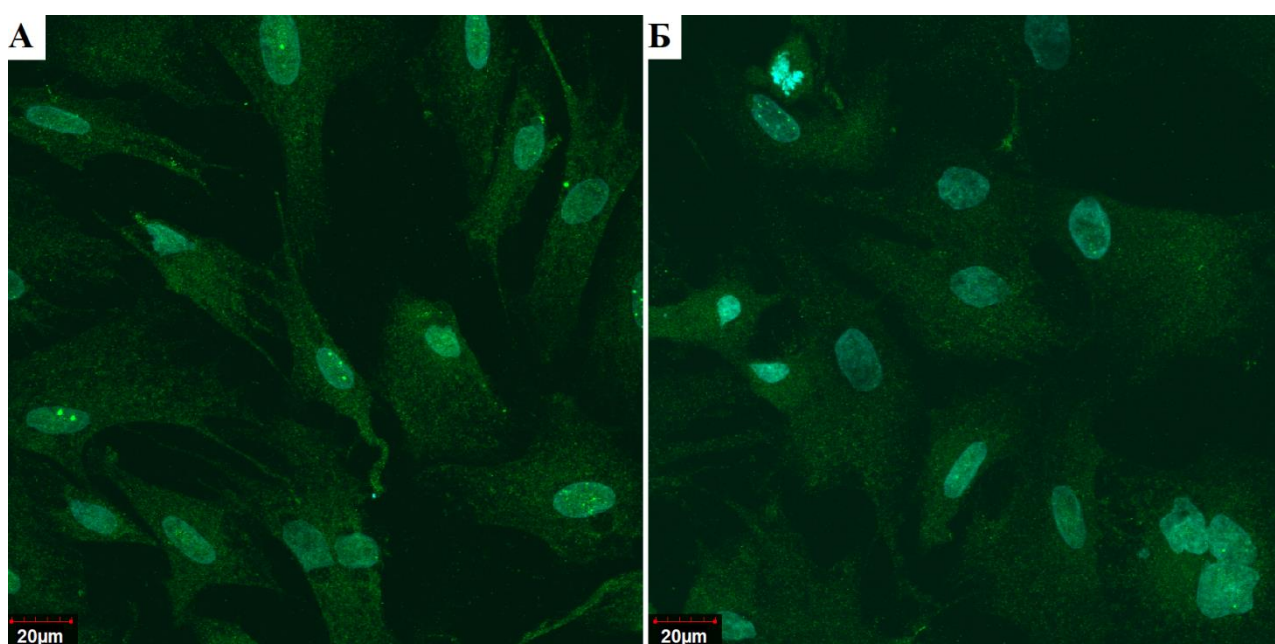


а – опытная группа; б – контрольная группа

Рисунок 14 – 2D культура РПЭ Р1, фазово-контрастная микроскопия,
ув. x 100

3.2 Результаты иммуноцитохимического исследования 2D культуры ретинального пигментного эпителия

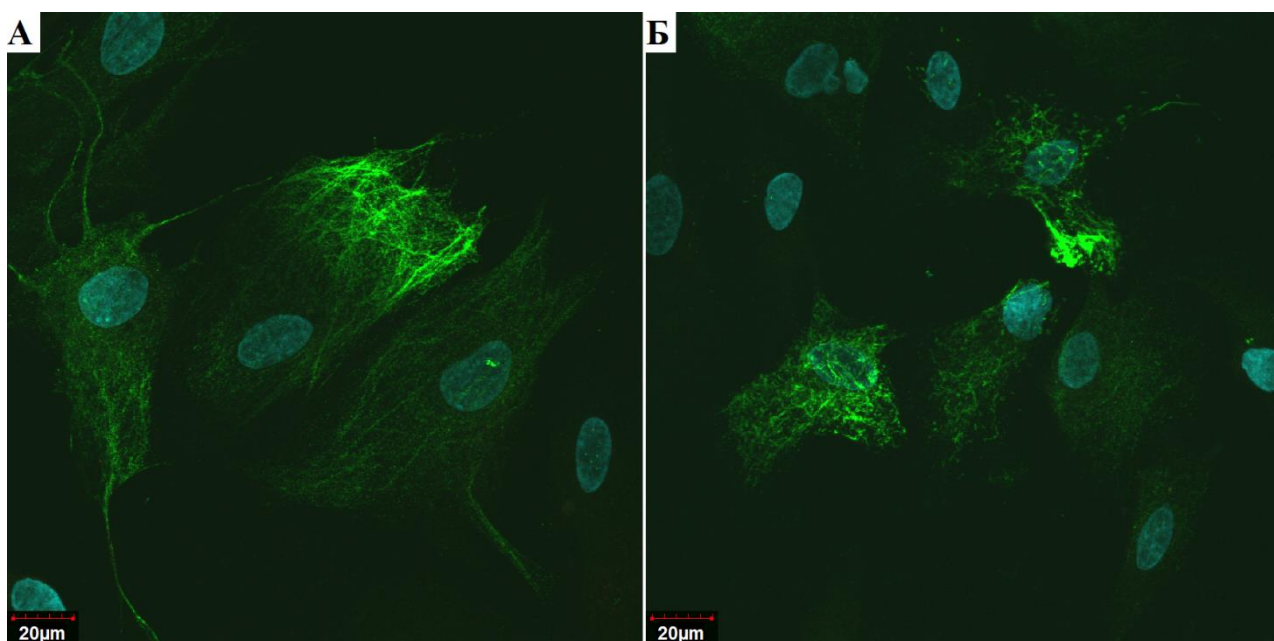
Проведенное иммуноцитохимическое исследование 2D культур РПЭ Р1 1-й опытной и 2-й контрольной групп, показало наличие ярко выраженной экспрессии высокоспецифичного маркера пигментного эпителия сетчатки RPE-65, что свидетельствовало о сохранности фенотипа полученных клеточных культур.



а – опытная группа; б – контрольная группа

Рисунок 15 – 2D культура РПЭ Р1, выраженная экспрессия маркера RPE-65 (AlexaFluor 488)

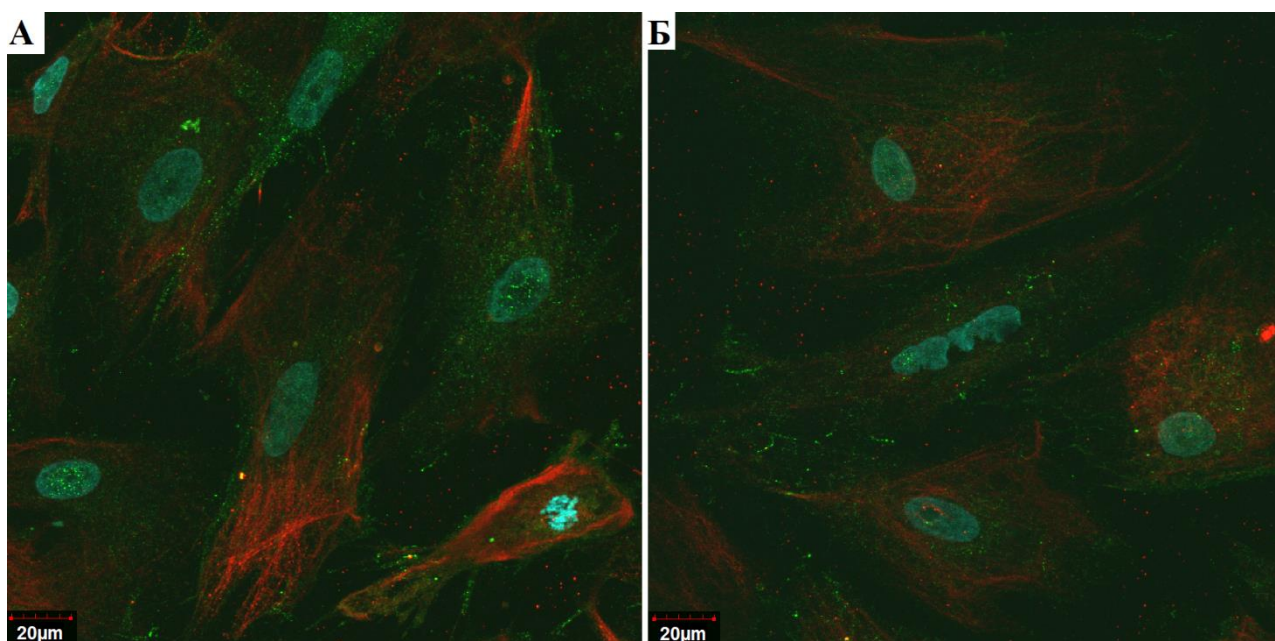
Экспрессия цитокератина 8, 18 (белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток) в обеих группах также была значительной.



а – опытная группа; б – контрольная группа

Рисунок 16 – 2D культура РПЭ Р1, выраженная экспрессия маркера цитокератина 8,18 (AlexaFluor 488)

В клеточных образцах РПЭ обеих групп также отмечали экспрессию маркера ZO-1 (белок запирающих межклеточных контактов) и умеренную экспрессию мезенхимального маркера виментина. Однако, согласно литературным данным, при 2D культивировании РПЭ возможно наличие данного маркера в 2D культуре, что не исключает эпителиальную природу полученных клеток. Известно, что данный белок часто появляется в культивируемых клетках наряду с исходным типом промежуточных филаментов. Так, было доказано, что при 2D культивировании РПЭ, в отличие от присутствия кератинсодержащих промежуточных филаментов, характерных для клеток РПЭ человека *in vivo*, наблюдается образование промежуточных филаментов цитоскелета, состоящих из виментина, и сохраняющихся при достижении полной конfluэнтности культуры клеток [71]. Также известно, что при 2D культивировании *in vitro* происходит нарушение межклеточных взаимоотношений, а также взаимоотношений клетка-межклеточный матрикс, и, как следствие – запуск процесса ЭМТ, что и обуславливает появление экспрессии виментина [128].



а – опытная группа; б – контрольная группа

Рисунок 17 – 2D культура РПЭ Р1. Экспрессия маркеров ZO-1 (AlexaFluor 488) и виментина (AlexaFluor 594)

Таким образом, проведенное иммуноцитохимическое исследование 2D культуры РПЭ Р1 показало, что клетки, выделенные и культивированные по предложенной технологии, сохранили свой фенотип. Также было установлено, что удвоенное количество ростовых факторов в питательной среде является допустимым и не способствует ЭМТ клеточных культур РПЭ.

Это дало возможность перейти к следующему этапу исследования – трехмерному клеточному культивированию РПЭ.

3.3 Результаты конструирования и культивирования 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия для трансплантации

Для конструирования 3D сфероидов использовали клетки РПЭ Р1 из 1-й опытной группы.

В первые 3 часа 3D культивирования в лунках агарозных планшетов под действием сил гравитации происходило медленное оседание клеток РПЭ.

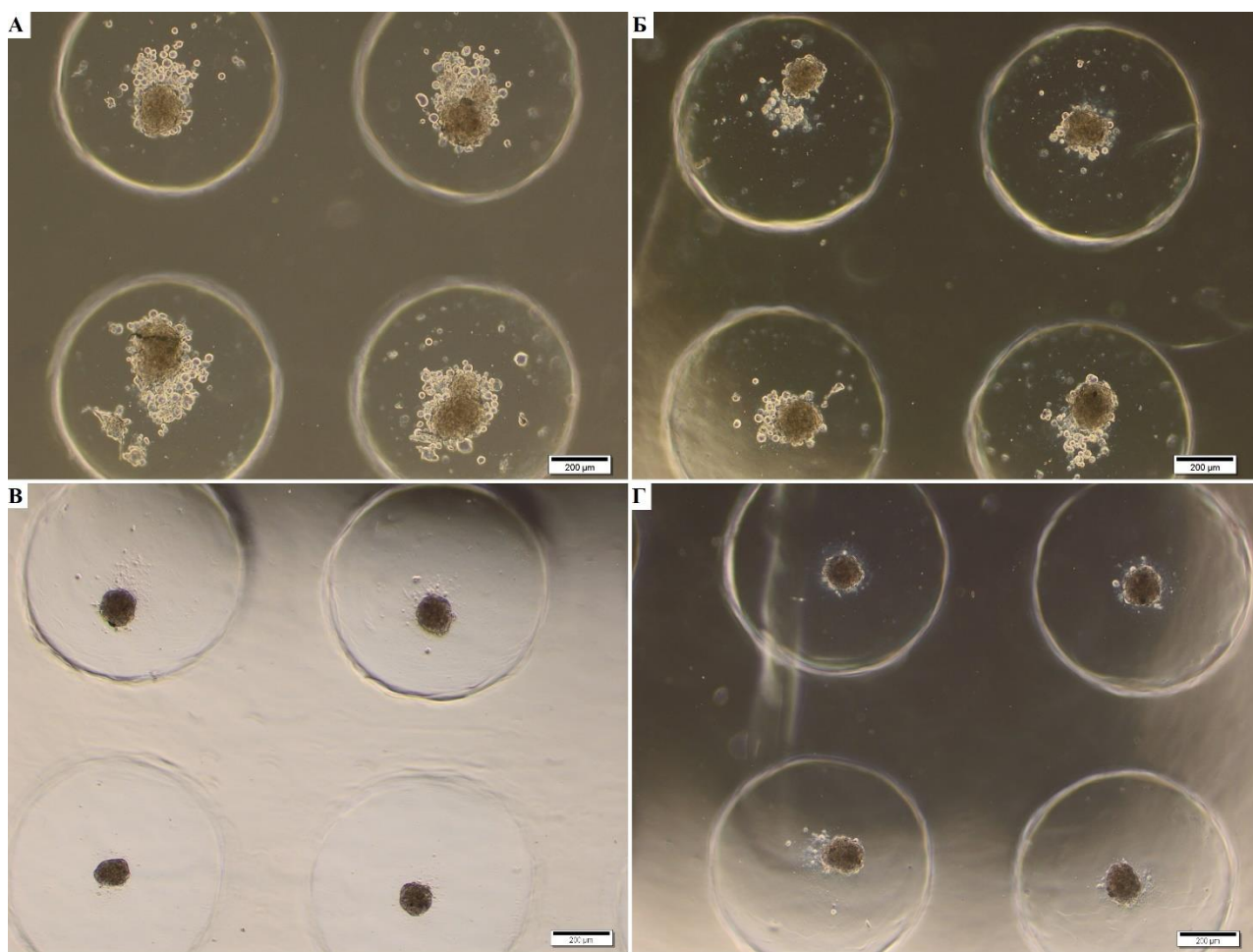
Параллельно с этим, в результате активного клеточного движения и клеточной адгезии, формировалась неопределенная клеточная масса РПЭ, состоящая из множества мелких агрегатов.

На 1-е сутки 3D культивирования формировались первые сфероиды РПЭ – по одному крупному или по несколько сфероидов среднего размера в одной лунке, которые в дальнейшем сливались в один большой сфероид.

На 3-й день 3D культивирования во всех лунках агарозных планшетов наблюдали формирование («сборку») одного большого сфероида РПЭ с гладкой поверхностью и умеренным количеством клеточного дебриса.

На 7-е сутки 3D культивирования визуализировали формирование «гладких» сфероидов РПЭ, клеточный дебрис практически отсутствовал.

В последующие сроки наблюдения форма и внешний вид трехмерных культур РПЭ оставались стабильными, отмечалось незначительное увеличение количества клеточного дебриса по мере увеличения сроков наблюдения.



а – 1-е сутки; б – 3-и сутки; в – 7-е сутки; г – 30-е сутки

Рисунок 18 – Формирование 3D сфероидов РПЭ в динамике, фазово-контрастная микроскопия, ув. х 200

Полученные многоклеточные микроагрегаты РПЭ имели приближенную к сфере, но все же неправильную форму. Известно, что объекты неправильной трехмерной формы не могут быть всесторонне описаны одним измерением. Для правильного измерения диаметра сфероидов применяли максимальный диаметр Ферета – результат одного измерения каждого объекта по его произвольной проекции, т.е. максимально возможное расстояние между двумя точками видимой на фотографии проекции сфероида.

При попарном применении t-критерия оказалось, что сфероиды статистически значимо уменьшались в диаметре в течение 1-й недели (во всех случаях $p < 0,05$ при сравнении диаметра сфероидов одного посевного

количества), и в дальнейшем не претерпевали статистически значимых изменений ($p > 0,05$ при сравнении диаметра сфероидов одного посевного количества на 7-е и 10-е, 10-е и 14-е, 14-е и 17-е, 17-е и 20-е, 20-е и 30-е сутки).

Анализ диаметра сфероидов позволил оценить возможность их трансплантации в субретинальное пространство при помощи современного хирургического инструментария для витреоретинальной хирургии. Так, при сравнении диаметра «гладких» сфероидов на 7-е и последующие сутки, было подтверждено, что полученные клеточные трансплантаты могут быть инъецированы субретинально через канюли минимального диаметра – 38-40G. Следовательно, 1000 клеток РПЭ в одном сфероиде является оптимальным количеством. В таблице 10 представлены результаты измерения диаметра 3D сфероидов РПЭ на различных сроках культивирования. Результаты измерений диаметра 3D сфероидов РПЭ оказались сопоставимыми с результатами авторов, полученных ранее при исследовании сфероидов, сконструированных из человеческого РПЭ.

Таблица 10 – Динамика изменения диаметра 3D сфероидов РПЭ

Сроки культивирования (сутки)	Средний диаметр 3D сфероидов РПЭ (мкм)
2	152,3 ± 14,5
3	135,9 ± 12,9
5	112,5 ± 10,8
7	98,8 ± 9,2
10	98,1 ± 9,0
14	97,9 ± 8,9
17	97,4 ± 8,7
20	96,8 ± 8,1
30	95,9 ± 7,8

3.4 Результаты исследований морфо-функциональных характеристик 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия

На данном этапе исследовали процесс реконструкции слоя РПЭ *in vitro* при помощи многоклеточных сфероидных микроагрегатов РПЭ – изучали процесс спрединга слоя клеток РПЭ, образующегося вокруг адгезирующихся к субстрату сфероидов, и давали качественное и количественное описания наблюдаемых явлений.. Адгезия сфероидов и распространение (спрединг) вокруг него слоя клеток – важнейшие составляющие процессов приживления трансплантатов РПЭ.

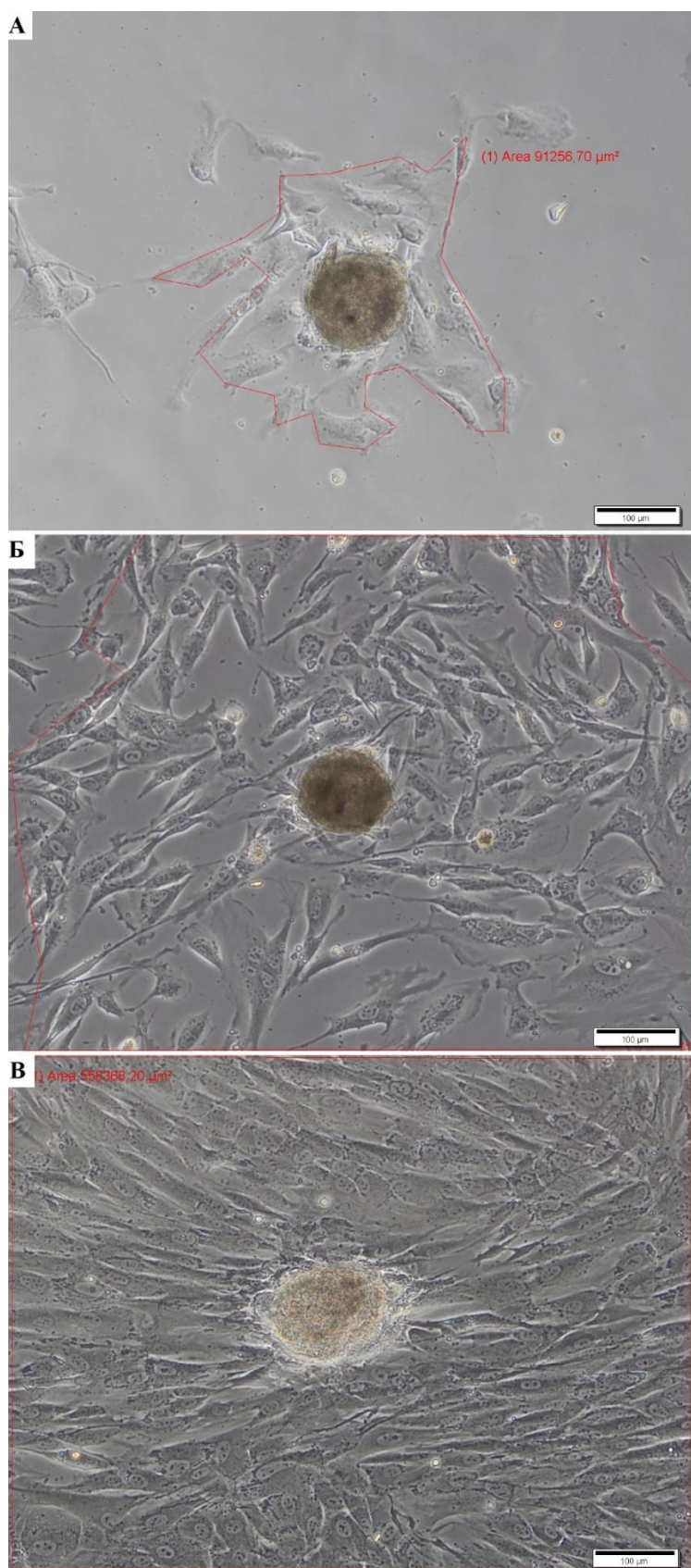
Сфероиды, полученные из клеток РПЭ Р1 в 1-й опытной группе, переносили из агарозных планшетов на культуральные матрасы и заливали 5 мл питательной среды стандартного состава. Для исследования использовали сфероиды на 4-е, 7-е и 11-е сутки культивирования.

Во всех опытных группах уже спустя 3 часа с помощью метода перкуссии отмечали адгезию большинства сфероидов (65%). На 1-е сутки сфероиды прикреплялись к поверхности дна лунок культуральных планшетов и в течение последующих дней «распластывались», образуя вокруг изначальной зоны прикрепления слой клеток пигментного эпителия.

Образуемые слои клеток были неоднородными. В центре клеточного слоя находился остаток сфероида («ядро» клеточного слоя). Непосредственно возле «ядра» образовывался пояс многоклеточного РПЭ шириной 50-200 мкм, плавно переходящий в монослой клеток РПЭ. Все три зоны появлялись отчетливо к концу 1-й недели 2D культивирования сфероидов и выявлялись вплоть до 14 дня. По своей морфологии клетки образуемого периферического монослоя имели форму, близкую к гексагональной, и имели пониженное содержание пигмента. Слой клеток распространялся неограниченно, достигая стенки культурального матраса. Распространение клеточных монослоев из

двух разных сфероидов останавливалось на стыке их фронтов, наползания слоев друг на друга ни в одном случае не наблюдали.

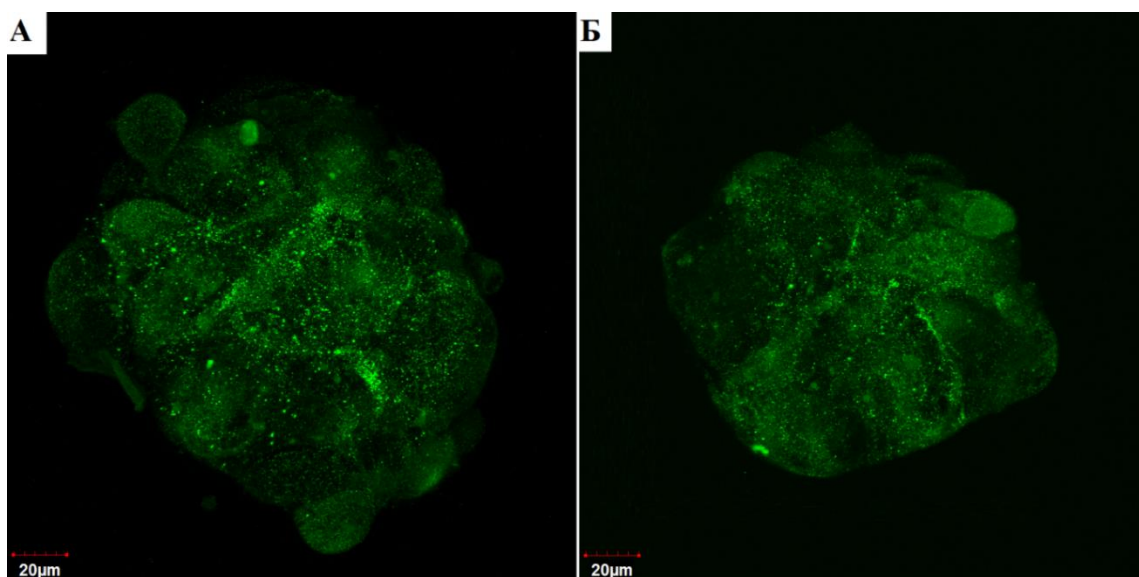
Таким образом, на четвертом этапе работы были определены качественные и количественные характеристики спрединга клеточных слоев вокруг адгезированных сфероидов. Средняя площадь слоя клеток, образуемого вокруг сфероидов, статистически достоверно увеличивалась в течение 1-й недели ($p < 0,05$) и статистически достоверно не изменялась в течение последующих сроков 2D культивирования ($p > 0,05$).



а – 1-е сутки; б – 3-и сутки; в – 7-е сутки

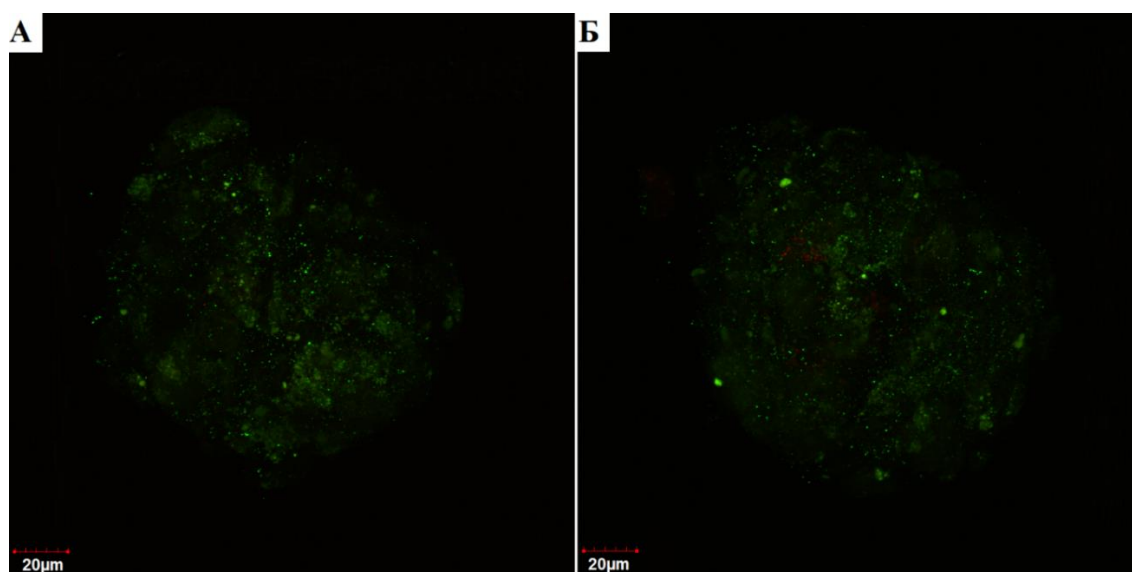
Рисунок 19 – Динамика образования клеточного слоя после адгезии 3D сфероидов РПЭ (нормотермическое культивирование)

При иммуноцитохимическом окрашивании было выявлено, что 3D сфероиды РПЭ (4-х, 7-и и 11-и суток культивирования) активно экспрессируют маркеры RPE-65 (высокоспецифичный маркер пигментного эпителия сетчатки), ZO-1 (белок запирающих межклеточных контактов) и цитокератин 8, 18 (белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток), и практически не экспрессируют мезенхимальный маркер виментин.



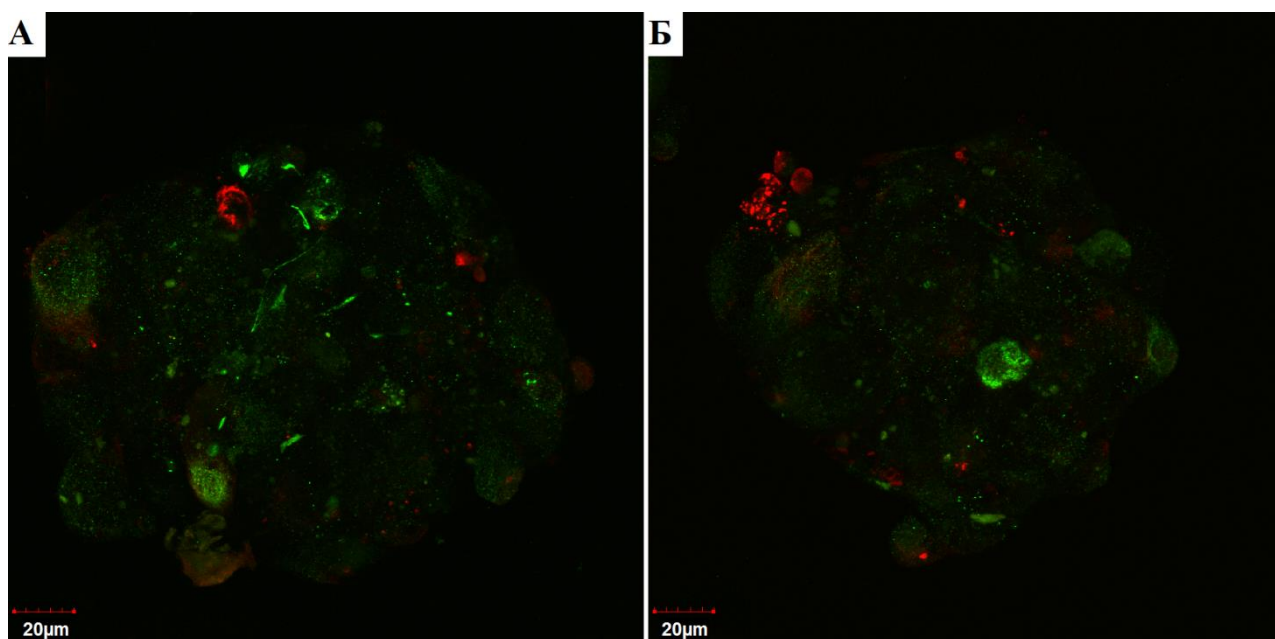
а – 4-е сутки культивирования; б – 11-е сутки культивирования

Рисунок 20 – 3D сфероиды РПЭ. Выраженная экспрессия маркера RPE-65



а – 4-е сутки культивирования; б – 11-е сутки культивирования

Рисунок 21 – Экспрессия маркера ZO-1



а – 4-е сутки культивирования; б – 11-е сутки культивирования

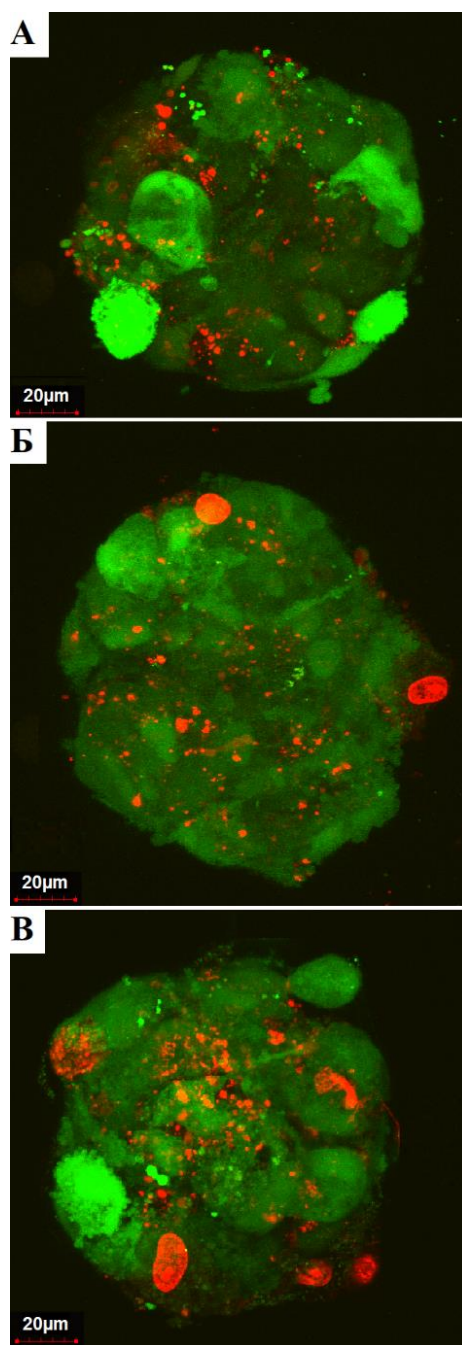
Рисунок 22 – Выраженная экспрессия цитокератина 8,18 (AlexaFluor 488) и слабая экспрессия виментина (AlexaFluor 594)

3.5 Оценка выживаемости и жизнеспособности 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия после нормотермического культивирования

Для исследования использовались сфероиды на 3-и, 7-е, 11-е, 20-е и 30-е сутки культивирования.

Половину сфероидов перемещали в пробирки типа «Эппендорф», окрашивали флюоресцентным маркером «Live and Dead» и изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Оставшиеся сфероиды переносились в чашку Петри объемом 5 мл и заливались 2 мл питательной среды стандартного состава. Затем чашку Петри помещали в CO₂-инкубатор на 14 дней, смену питательной среды осуществляли каждые 2-3 дня. Затем через 3 часа, через 1 сутки, далее ежедневно исследовали при помощи инвертированного микроскопа адгезивные свойства сфероидов и их способность к спредингу.

Во время проведения лазерной сканирующей конфокальной микроскопии после окрашивания 3D сфероидов РПЭ маркером «Live and Dead» было выявлено, что полученные трехмерные культуры сохраняют свою жизнеспособность на всех сроках наблюдения. Все сфероиды полностью состояли из жизнеспособных клеток. Количество «мертвых» клеток было минимально и не превышало допустимых значений.



а – 7-е сутки культивирования; б – 20-е сутки культивирования;
в – 30-е сутки культивирования

Рисунок 23 – 3D сфероиды РПЭ после нормотермического культивирования

3.6 Оценка выживаемости и жизнеспособности 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия после краткосрочной гипотермической консервации

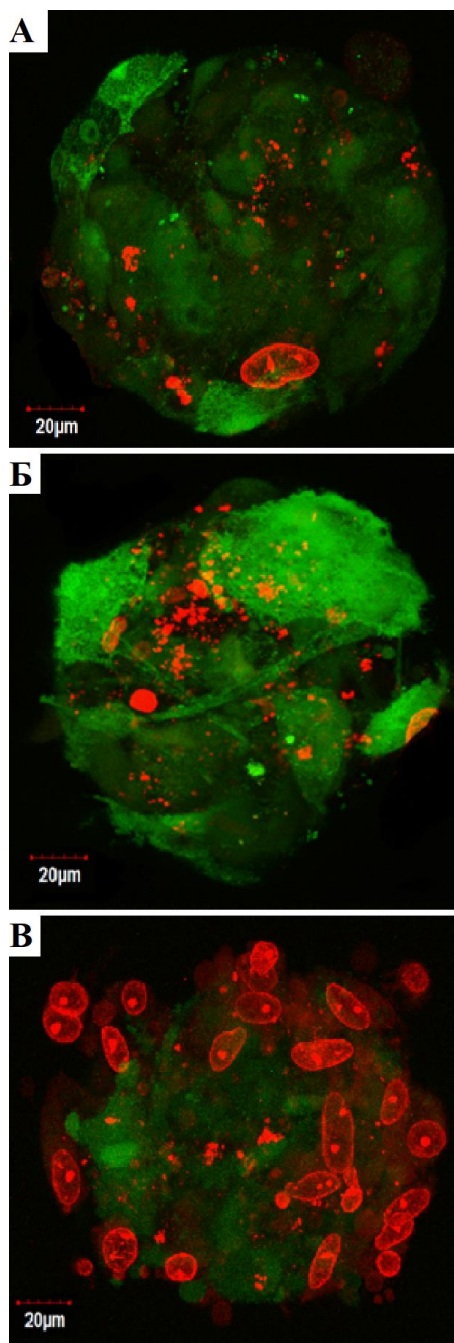
В связи с необходимостью доставки клеточных трансплантатов из культуральных лабораторий в операционные блоки, в данном случае из Головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в Калужский филиал, были изучены параметры выживаемости и жизнеспособности 3D сфероидов РПЭ после краткосрочного гипотермического воздействия (до 4 часов при $t=+4^{\circ}\text{C}$) с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания маркером «Live and Dead», а также способность сфероидов к адгезии и спредингу.

3.6.1 Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия после пребывания в условиях гипотермии

Для исследования использовались сфероиды на 4-е, 7-е и 11-е сутки культивирования.

Агарозные плашеты ($n=3$), каждый из которых содержал 81 сфероид, помещали в холодильник при $+4^{\circ}\text{C}$ на 4 часа. Затем половину сфероидов перемещали в пробирки типа «Эппендорф», окрашивали флюоресцентным маркером «Live and Dead» и изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Оставшиеся сфероиды переносили в чашку Петри объемом 5 мл и заливали 2 мл питательной среды стандартного состава. Затем чашку Петри помещали в CO_2 -инкубатор на 14 дней, смену питательной среды осуществляли каждые 2-3 дня. Затем через 3 часа, через 1 сутки, далее ежедневно исследовали при помощи инвертированного микроскопа адгезивные свойства сфероидов и их способность к спредингу. Во время проведения лазерной сканирующей конфокальной микроскопии после

окрашивания 3D сфероидов РПЭ маркером «Live and Dead» было выявлено, что полученные трехмерные культуры сохраняют свою жизнеспособность на всех сроках наблюдения (4-е, 7-е и 11-е сутки). 4-х и 7-и суточные сфероиды полностью состояли из жизнеспособных клеток. В сфероидах на 11-е сутки культивирования отмечалось значительное преобладание «мертвых» клеток.



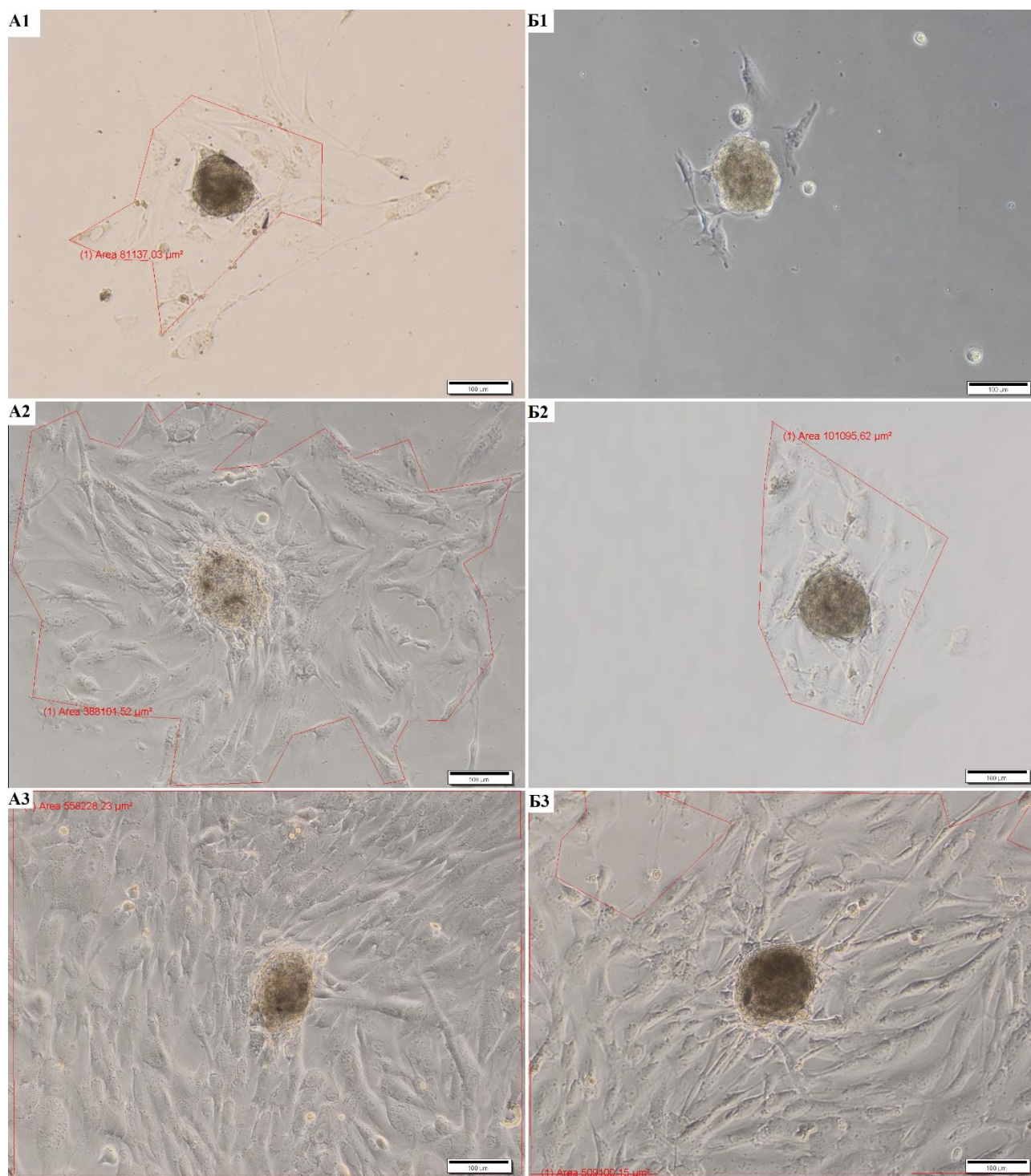
а – 4-е сутки культивирования; б – 7-е сутки культивирования; в – 11-е сутки
культивирования

Рисунок 24 – 3D сфероиды РПЭ после пребывания в условиях гипотермии,
окрашивание «Live and Dead»

3.6.2 Результаты исследования адгезивных свойств 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия и способность к спредингу после пребывания в условиях гипотермии

При изучении 4-х и 7-и суточных сфероидов было выявлено, что большинство сфероидов (52%) проявляют адгезию уже через 3 часа после переноса агарозного планшета из холодильника и пересевания на чашку Петри. На следующий день все сфероиды были адгезированы и начинали образовывать вокруг себя клеточный слой, состоящий из клеток гексагональной формы. По мере увеличения сроков наблюдения площадь клеточного слоя увеличивалась, образованный вокруг сфероида клеточный слой преимущественно состоял из клеток гексагональной формы. Данные были сопоставимыми при аналогичном исследовании сфероидов после нормотермического культивирования ($p < 0,05$).

Все 11-ти суточные сфероиды через 3 часа после переноса агарозного планшета из холодильника и пересевания на чашку Петри не были адгезированы. На 1-е сутки часть трансплантатов была адгезирована (41%), оставшиеся трансплантаты оставались неадгезированными в течение всего срока наблюдения. Образованный вокруг адгезированных сфероидов клеточный слой преимущественно состоял из клеток гексагональной формы. По мере увеличения сроков наблюдения площадь клеточного слоя также увеличивалась, однако, была статистически меньше чем у 3-х и 7-и суточных сфероидов ($p < 0,05$). Также, клетки были расположены менее плотно и монослой содержал оптически пустые пространства.



a1 - a3 – 7-суточные сфероиды на 1-е, 3-и и 7-е сутки;

б1 - б3 – 11-суточные сфероиды на 1-е, 3-и и 7-е сутки

Рисунок 25 – Динамика образования клеточного слоя после адгезии 3D сфероидов РПЭ (гипотермическое культивирование)

Таким образом, было установлено, что сфероиды РПЭ на всех исследуемых сроках после пребывания в условиях гипотермии показали высокую выживаемость, однако 11-ти суточные сфероиды были менее жизнеспособны, т.к. имели в своем составе значительное количество «мертвых» клеток, проявляли менее выраженные адгезивные способности и при спрединге образовывали клеточный слой, меньший по площади, чем у трех- и 7-и суточных сфероидов.

Полученные результаты морфо-функциональных характеристик 3D клеточных сфероидов РПЭ после гипотермической консервации в процессе их нормотермического культивирования (1-х – 14-и суток) соответствуют таковым для интактных культур, не подвергнутых гипотермическому воздействию.

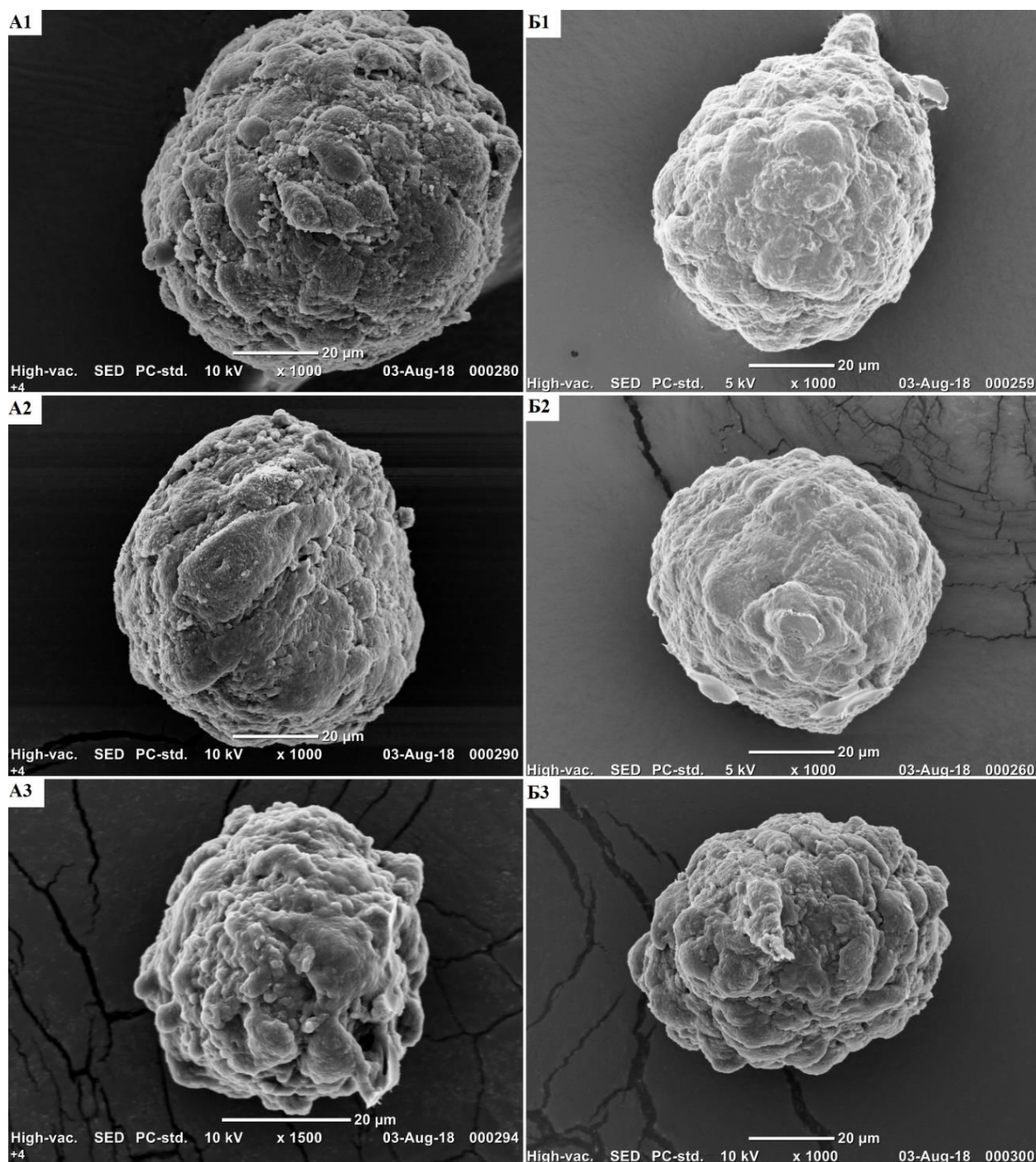
Было сделано заключение, что выживаемость и жизнеспособность 3D клеточных сфероидов РПЭ, подвергнутых краткосрочной гипотермической консервации (до 4-х часов) сохраняется в полном объеме, что не препятствует их последующей трансплантации.

3.7 Результаты сканирующей электронной микроскопии

При СЭМ 3D сфероидов 1-й опытной (гипотермическая консервация) и 2-й контрольной (нормотермическое культивирование) групп визуализировали клеточные трансплантаты округлой формы. Сфероиды контрольной группы имели относительно гладкую поверхность. Поверхность сфероидов опытной группы выглядела умеренно бугристой. По мере увеличения сроков культивирования отмечали уменьшение диаметра сфероидов, поверхность сфероидов становилась более бугристой. Данные измерения диаметра сфероидов на 4-е, 7-е и 11-е сутки культивирования 1-й и 2-й групп при СЭМ оказались сопоставимыми с результатами, полученными в разд. 3.3 на аналогичные сроки культивирования ($p > 0,05$).

Таблица 11 – Диаметр 3D сфероидов РПЭ при СЭМ

1-я опытная группа		2-я контрольная группа	
Сроки культивирования, сутки	Диаметр, мкм	Сроки культивирования, сутки	Диаметр, мкм
4	133,2 ± 12,7	4	134,4 ± 12,8
7	96,9 ± 9,0	7	97,9 ± 9,1
11	95,8 ± 8,9	11	97,1 ± 9,0



а1-а3 – 1-я опытная группа, 4-е, 7-е и 11-е сутки культивирования;
 б1-б3 – 2-я контрольная группа, 4-е, 7-е и 11-е сутки культивирования
 Рисунок 26 – 3D сфероиды РПЭ,
 сканирующая электронная микроскопия, ув. x 1000

Таким образом, в ходе проведения исследований *in vitro*, было установлено, что модифицированная техника выделения РПЭ является приемлемой для кадаверных кроличьих глаз. 2D культивирование РПЭ с

удвоенным количеством ростовых факторов в питательной среде достоверно способствует увеличению количества клеток за меньший промежуток времени и не вызывает ЭМТ клеточных культур, что подтверждено иммуноцитохимическими исследованиями. Клетки кроличьего РПЭ, культивированные в форме многоклеточных 3D сфероидов, оставались жизнеспособными и сохраняли фенотип вплоть до 30-х суток культивирования при нормотермическом культивировании и 11-ти суток после краткосрочной гипотермической консервации, что также подтверждено иммуноцитохимическими исследованиями. Также было доказано, что 3D сфероиды РПЭ сохраняли жизнеспособность после пребывания в условиях гипотермии (+4°C) в течение 4-х часов и проявляли адгезию и спрединг на плоской поверхности, что явилось необходимым условием для успешной субретинальной трансплантации после транспортировки клеточных культур при низкой температуре. Это дало возможность перейти к следующему этапу диссертационного исследования – трансплантации полученных 3D клеточных сфероидов РПЭ кроликам-донорам.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНИКИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ФОРМЕ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ

В данной главе представлены результаты исследования *in vivo* согласно 2-й и 3-й задачам диссертационного исследования. На данном этапе на кроликах разрабатывали хирургическую технику трансплантации 3D сфероидов РПЭ. В послеоперационном периоде, с целью подтверждения безопасности и эффективности предложенной хирургической техники на микроскопическом уровне, проводили морфологическое исследование внутриглазных оболочек с помощью световой микроскопии гистологических срезов.

4.1 Разработка модифицированной микрохирургической техники трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия на глазах кроликов

За основу собственной модификации была взята хирургическая техника, описанная в разделе 2.3.1. На предложенный в данной работе «Способ трансплантации ретинального пигментного эпителия в форме 3D клеточных сфероидов в эксперименте» получен патент РФ на изобретение № 2704094 с приоритетом от 22.08.2019. Авторы: Борзенко С.А., Хаценко Е.И., Горшков И.М., Плахотный М.А., Трифаненкова И.Г.

Разработанная модифицированная хирургическая техника

Всем кроликам за 30 минут до операции в конъюнктивальную полость оперируемого глаза инстиллировали 1-2 капли 1% раствора тропикамида для достижения медикаментозного мидриаза. В качестве анестезии выполняли общий наркоз, который осуществляли внутримышечным введением 1% раствора гексенала из расчета 0,5 мл на 1 кг веса животного. Общее

обезболивание дополняли 3-кратной инстилляцией в конъюнктивальную полость 0,5% раствора проксиметакаина. Перед операцией конъюнктивальную полость промывали раствором пиклоксидина 0,05%. Иммобилизацию животных производили путем тугого бинтования.

Под контролем операционного микроскопа Opton CFC-6 (Carl Zeiss, Германия) проводили лимбальную перитомию. В 2 мм от лимба на 2, 8 и 10 часах устанавливали три порта 25G в проекции плоской части цилиарного тела для входа эндовитреального инструментария и инфузионной системы. Фиксировали инфузионную систему, вводили световод, витреотом, выполняли витрэктомию (2500 резов в минуту, вакуум 600 мм рт. ст.) с удалением центральных и задних отделов стекловидного тела (витреоретинальная система Accurus, Alcon, США). Далее канюлей 25G с острым кончиком 39G (RUMEX International, США) делали ретинопунктуру выше места центральной зоны сетчатки на 2-3 мм. Кроликам из опытных групп субретинально инъецировали 3D сфероиды РПЭ в количестве 81 (10 кроликов – 1-я опытная группа) или 162 (10 кроликов – 2-я опытная группа). Клеточные культуры трансплантировали в жидкой среде – 50 мкл стерильного физиологического раствора (*англ.* balanced sterile saline solution – BSS Plus, сбалансированный стерильный солевой раствор, Bausch & Lomb, США). Животным из контрольной группы субретинально вводили 50 мкл стерильного физиологического раствора.



Рисунок 27 – Микроинвазивная трехпортовая 25G витрэктомия

Устройство для введения клеточных трансплантатов представляет собой шприц с адаптером (MicroDose injection kit 1 ml, Med One, США), подключаемый к аппарату для комбинированной хирургии. При нажатии на педаль управления витреоретинальной системой поршень начинает ход, и вещество из шприца доставляется субретинально.



Рисунок 28 – Устройство для субретинальной инъекции MicroDose injection kit 1 ml (Med One, США) и канюля 25G с острым кончиком 39G (RUMEX International, США)

ЭЛК сетчатки вокруг ретинопунктурного отверстия не проводилась. Операции завершали аспирацией жидкости из витреальной полости с заменой на стерильный воздух и наложением швов на склеральные разрезы и конъюнктиву (Coated Vicryl 8-0, Ethicon, США). В послеоперационном

периоде всем кроликам проводилась стандартная антибактериальная и противовоспалительная терапия в течение двух недель.

Таким образом, на данном этапе, была разработана модифицированная микрохирургическая техника субретинальной трансплантации 3D сфероидов РПЭ, заключающаяся в проведении 25G витрэктомии, ретинопунктуры и субретинальном введении 3D сфероидов РПЭ с тампонадой витреальной полости воздухом. Ни в одном случае не было выявлено интраоперационных осложнений, не потребовалось тампонады витреальной полости СМ. По завершению операционного вмешательства сетчатка прилежала во всех случаях, необходимости в проведении ЭЛК не возникло. Следовательно, разработанная модифицированная микрохирургическая техника может считаться малоинвазивной и малотравматичной.

4.2 Результаты гистологического исследования

В энуклеированных глазах опытных и контрольной групп в течение всего срока наблюдения не было обнаружено патологических изменений внутриглазных структур. В зоне склеротомических разрезов в области плоской части цилиарного тела наблюдали раневой канал без пролиферативных изменений в близлежащих структурах глаза. Склера имела нормальное строение без каких-либо изменений со стороны коллагеновых волокон. Роговица, радужка и цилиарное тело сохраняли нормальную структуру и целостность. В витреальной полости патологических клеточных элементов обнаружено не было.

Во всех отделах на всех сроках исследования архитектоника сетчатки была сохранна: отсутствовали деструктивные изменения, не выявлено каких-либо признаков повреждения фоторецепторов, стратификация слоев не

нарушена, пролиферативных изменений не отмечено. Изменений в ДЗН и центральных сосудах сетчатки не наблюдали. Сосудистая оболочка прилежала на всем протяжении, отека не выявлено, отслойки цилиарного тела обнаружено не было. Ни в одном случае не визуализировали клеточные трансплантаты в витреальной полости. Во всех опытных глазах и в глазах контрольной группы на всем протяжении эксперимента внутриглазные структуры имели нормальное строение без каких-либо значимых патологических морфологических изменений.

В 1-е сутки после проведения хирургического вмешательства на всех глазах опытных групп субретинально обнаруживали округлые конгломераты диаметром 50-80 мкм, адгезированные к нативному РПЭ кроликов-реципиентов – предположительно 3D сфероиды РПЭ. Адгезия 3D сфероидов РПЭ является признаком жизнеспособности клеточных трансплантатов. Также отмечали утолщение сетчатки, что являлось естественной патофизиологической реакцией в ответ на операционную травму. В контрольной группе также визуализировали утолщение сетчатки.

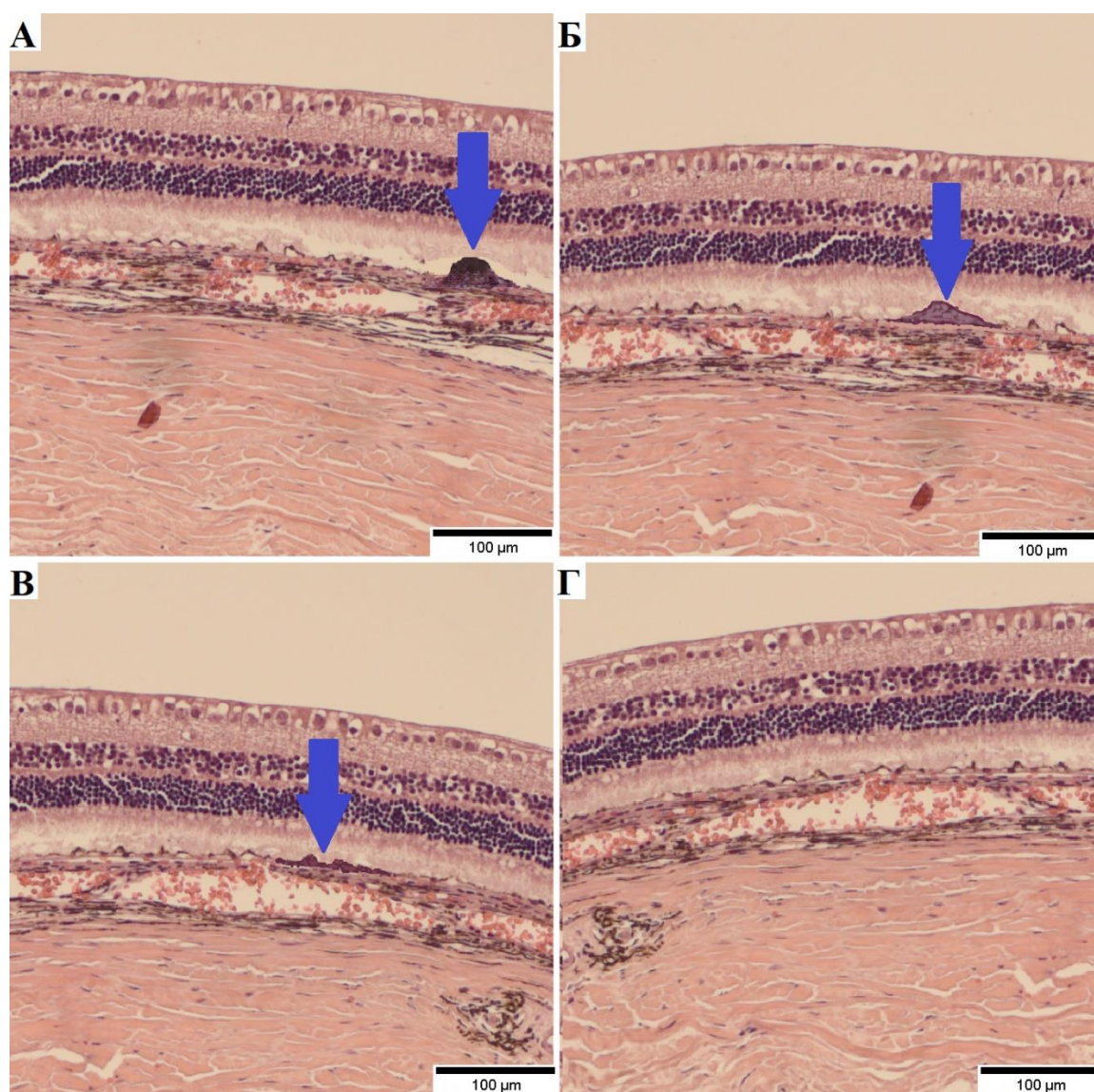
На 3-и сутки на всех глазах опытных групп также субретинально были обнаружены 3D сфероиды РПЭ, адгезированные к нативному РПЭ и имеющие тенденцию к уплощению, что свидетельствует о начале процесса спрединга. Утолщение сетчатки по-прежнему сохранялось во всех группах.

На 7-е сутки на всех глазах опытных групп субретинально визуализировали уплощенные трансплантаты, адгезированные к РПЭ реципиентов и образующие новый клеточный слой, что свидетельствует о продолжении процесса спрединга. Толщина сетчатки в опытных и контрольной группах уменьшалась.

На 10-е сутки на всех глазах опытных групп субретинально визуализировали клеточный слой РПЭ, толщина сетчатки в опытных и

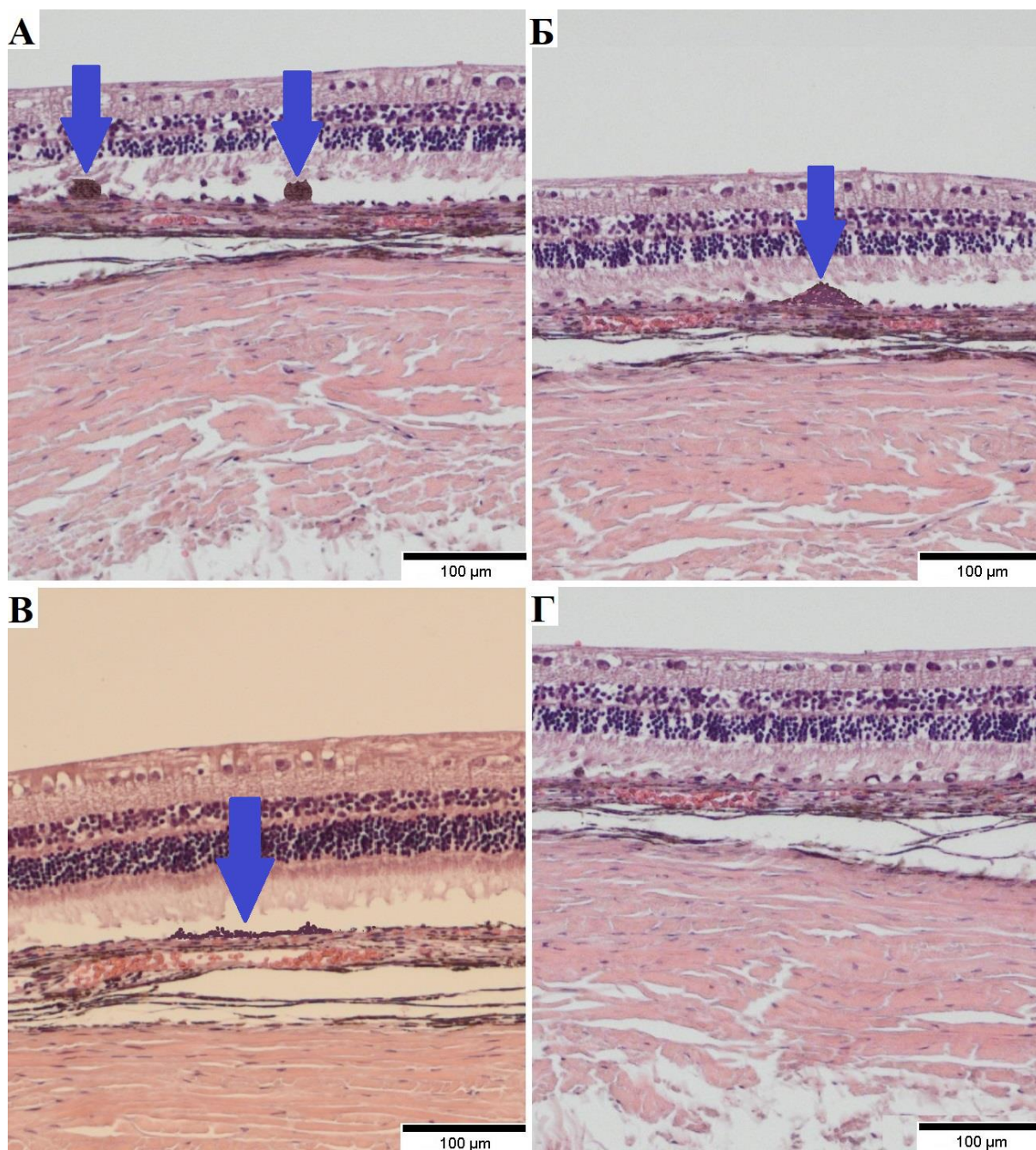
контрольной группой была объективно меньше, чем на предыдущие сутки наблюдения.

На 14-е сутки на всех глазах опытных и контрольной групп сетчатка выглядела интактно, утолщения и дегенеративных изменений фоторецепторов не было обнаружено, отмечалось прилегание к сосудистой оболочке. Между сетчаткой и хориоидеей визуализировался монослой РПЭ. В последующие сроки наблюдения морфологическая картина внутриглазных структур кроликов была стабильна.



а – 1-е сутки; б – 3-и сутки; в – 7-е сутки; г – 10-е сутки

Рисунок 29 – Гистологические срезы, окраска гематоксилин-эозин, ув. х 100, 1-я опытная группа. Трансплантаты РПЭ указаны стрелками



а – 1-е сутки; б – 3-и сутки; в – 7-е сутки; г – 10-е сутки

Рисунок 30 – Гистологические срезы, окраска гематоксилин-эозин, ув. х 100, 2-я опытная группа. Трансплантаты РПЭ указаны стрелками

Таким образом, в ходе проведения гистологического исследования, было показано, что сфероиды РПЭ, трансплантируемые субретинально по предложенной технологии, являются жизнеспособными, так как адгезируются

к нативному РПЭ кроликов-реципиентов и по мере увеличения сроков наблюдения распластываются, что способствует образованию нового клеточного слоя РПЭ. Также, ни в одном случае не было обнаружено 3D сфероидов в витреальной полости, что свидетельствует о том, что клеточные трансплантаты не диссеминируют в витреальную полость. Отсутствие структурных нарушений со стороны оболочек глаза и его внутренних сред на микроскопическом уровне подтвердило безопасность субретинальной трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов.

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЙ И МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В РАННЕМ И ОТДАЛЕННОМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ПЕРИОДАХ

На данном этапе, с целью подтверждения безопасности и эффективности предложенной в работе хирургической техники трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов, согласно 4-й – 6-й задачам диссертационного исследования, кроликам проводили стандартное (биомикроскопия, офтальмоскопия, фоторегистрация переднего и заднего отрезка глаза, УЗ В-сканирование) и специализированное (ЭРГ и ОКТ сетчатки) офтальмологическое обследование.

5.1 Клинико-морфологическое обоснование безопасности техники трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия

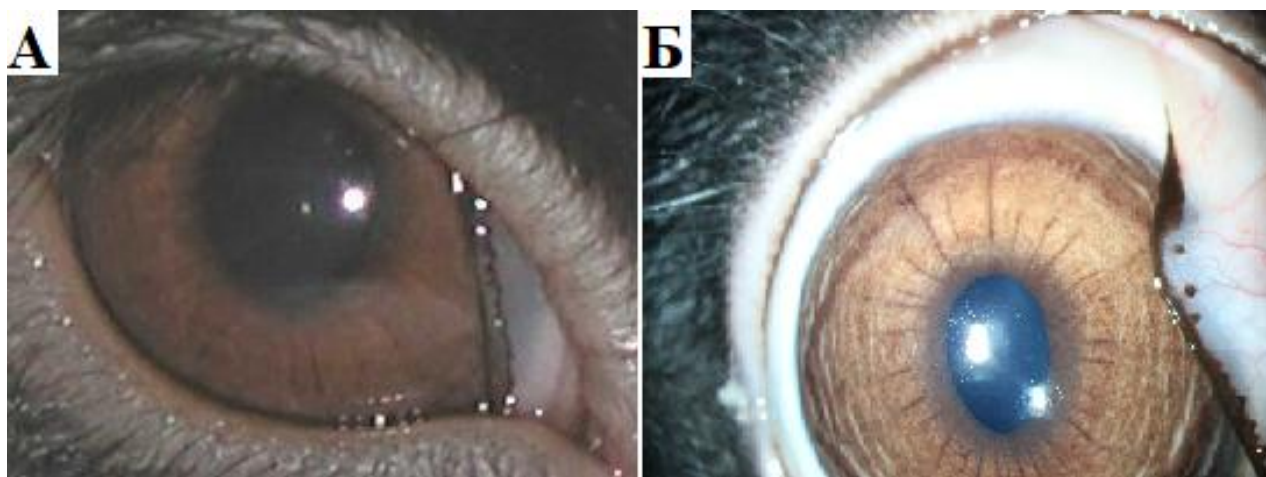
С целью подтверждения безопасности предложенной хирургической техники всем кроликам в послеоперационном периоде выполняли стандартное офтальмологическое обследование, включающее: биомикроскопию, офтальмоскопию, фоторегистрацию переднего и заднего отрезка глаза и УЗ В-сканирование внутриглазных оболочек.

5.1.1 Результаты биомикроскопии

При биомикроскопии в 1-е сутки после оперативного вмешательства клиническая картина на всех глазах у прооперированных животных была схожей: отмечалась конъюнктивальная инъекция в зоне склеротомических и конъюнктивальных разрезов, швы были адаптированы, роговица прозрачная, передняя камера средней глубины, влага передней камеры прозрачная, радужка структурная, зрачок округлый в центре. Значимых помутнений в хрусталике, снижающих визуализацию глазного дна, выявлено не было.

Уровень воздуха составлял $1/3 - 1/2$ от объема витреальной полости. Рефлекс с глазного дна был розовый во всех случаях.

По мере увеличения сроков наблюдения глаза у всех кроликов успокаивались, уровень воздуха в витреальной полости снижался и к 7-м суткам полностью отсутствовал. К 10-м суткам шовный материал в зоне склеротомических и конъюнктивальных разрезов практически не визуализировали. Оптические среды оставались прозрачными и позволяли визуализировать глазное дно на всем периоде наблюдения. Рефлекс с глазного дна оставался розовым. Биомикроскопическая картина на последующих сроках наблюдения у всех кроликов была стабильной.



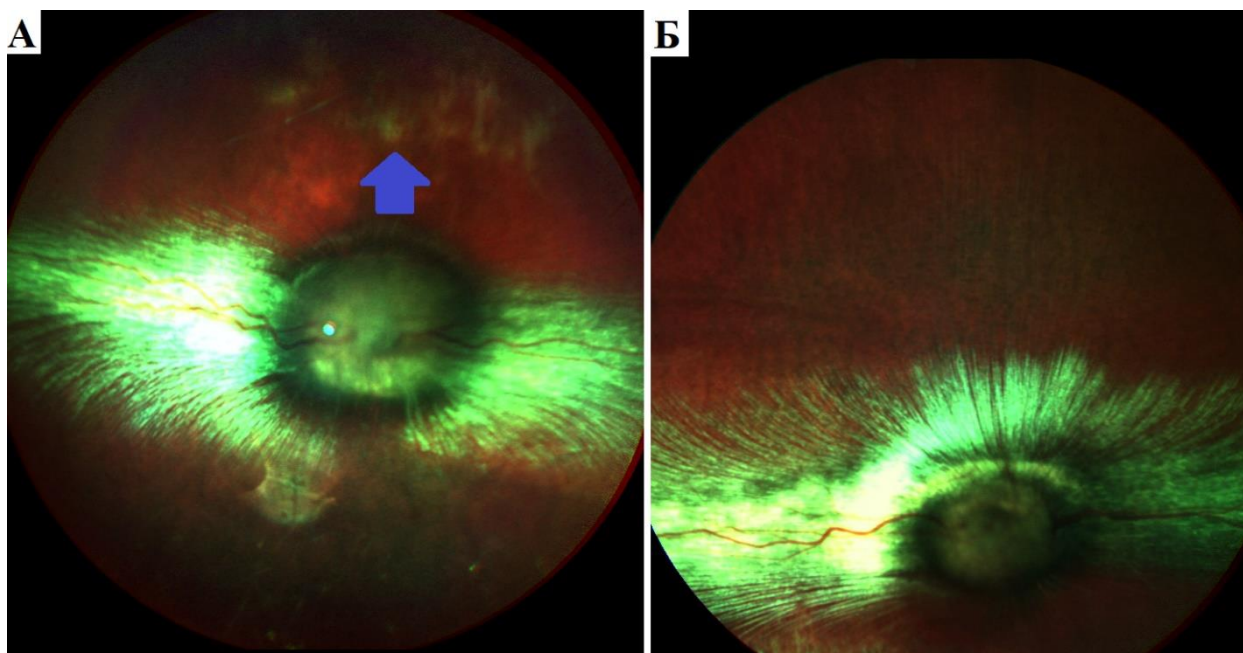
а – 1-е послеоперационные сутки; б – 10-е послеоперационные сутки

Рисунок 31 – Биомикроскопия кролика из 1-й опытной группы

5.1.2 Результаты офтальмоскопии

В 1-е сутки при бинокулярной обратной офтальмоскопии на всех прооперированных глазах опытных и контрольной групп офтальмоскопировался бледно-розовый ДЗН с четкими границами, в зоне субретинальной инъекции отмечали наличие локальной плоской ОС, ретинопунктурное отверстие не визуализировали.

На 3-и – 7-е сутки во всех случаях отмечали прилегание оболочек, ретинопунктурное отверстие также не визуализировали, ДЗН оставался бледно-розовым. Офтальмоскопическая картина на последующих сроках наблюдения у всех кроликов была стабильной.



а – 1-е послеоперационные сутки, стрелкой указано место введения трансплантатов; б – 7-е послеоперационные сутки

Рисунок 32 – Глазное дно кролика из 2-й опытной группы

5.1.3 Результаты ультразвукового В-сканирования

При проведении УЗ В-сканирования внутриглазных оболочек у всех кроликов на 1-е сутки в витреальной полости визуализировался воздух, занимающий 1/3 – 1/2 объема витреальной полости. Также, у всех экспериментальных животных визуализировали локальную плоскую ОС в зоне введения 3D сфероидов РПЭ ОС (1-я опытная группа – $0,34 \pm 0,03$ мм, 2-я опытная группа – $0,39 \pm 0,03$ мм, контрольная группа – $0,27 \pm 0,02$ мм). Динамика высоты ОС в опытных и контрольной группах представлена в таблице 12. В остальных зонах сетчатка прилежала. Ни у одного из животных

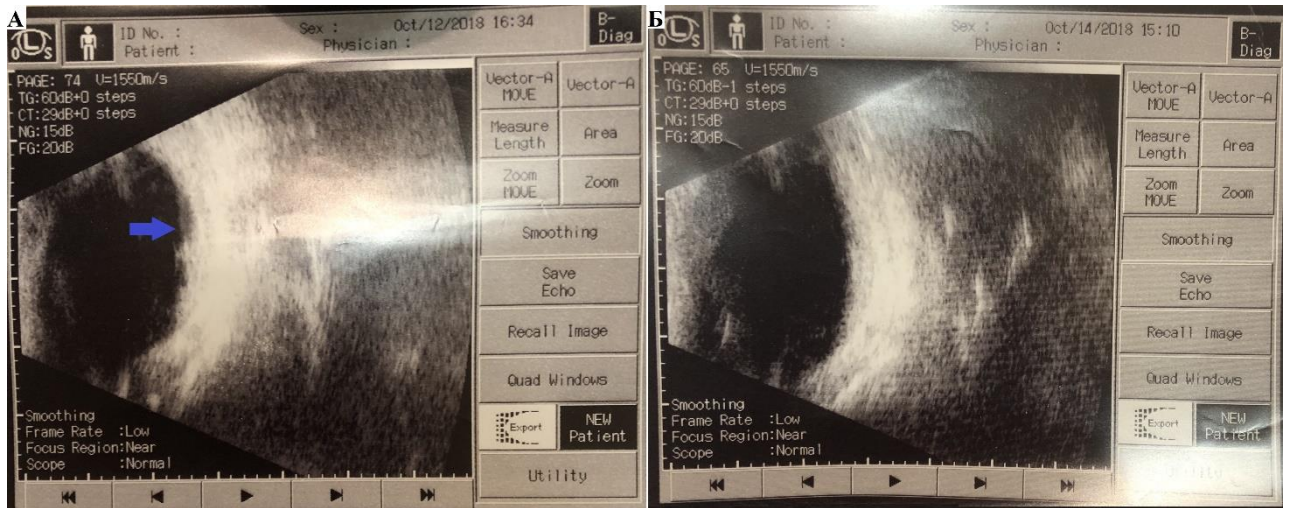
не было выявлено отека внутриглазных оболочек, гемофтальма, экссудата или других патологических изменений.

На 3-и сутки у всех экспериментальных животных воздух занимал менее 1/3 от объема витреальной полости. У всех кроликов опытных и контрольной групп визуализировали прилегание сетчатки, состояние внутриглазных оболочек и витреальной полости выглядело интактно. Витреальная полость выглядела акустически прозрачной.

Проведение В-сканирования в последующие сроки не выявило изменений внутриглазных оболочек и витреальной полости ни у одного из экспериментальных животных.

Таблица 12 – Динамика высоты локальной отслойки сетчатки у кроликов после оперативного вмешательства по данным В-сканирования

Сутки, кол-во кроликов - n	Высота ОС, мм		
	1-я опытная группа	2-я опытная группа	Контрольная группа
1, n=30	0,34 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,27 ± 0,02
3, n=27	—	—	—



а – 1-е сутки, локальная плоская отслойка сетчатки в зоне трансплантации 3D сфероидов РПЭ; б – 3-и сутки, сетчатка прилежит

Рисунок 33 – Ультразвуковое В-сканирование, ролик из 1-й опытной группы

Таким образом, можно сделать вывод, что предложенная хирургическая техника вызывает локальную плоскую ОС в раннем послеоперационном периоде в зоне введения клеточных трансплантатов. Однако данное явление является обратимым, а высота ОС напрямую зависит от количества трансплантируемых клеточных культур.

5.2 Результаты электроретинографии

С целью подтверждения безопасности предложенной в данной работе хирургической техники всем кроликам выполняли электроретинографическое исследование для оценки функционального состояния нейросенсорной сетчатки после субретинальной трансплантации 3D сфероидов РПЭ.

За норму были приняты показатели ЭРГ, полученные до проведения оперативного вмешательства: амплитуда а-волны – $45,8 \pm 4,2$ мкВ, латентность – $18,2 \pm 1,3$ мс, и амплитуда b-волны – $86,3 \pm 7,3$ мкВ, латентность

– $48,7 \pm 1,2$ мс. Полученные показатели дооперационной ЭРГ у кроликов являются сопоставимыми с данными литературы [22].

В раннем послеоперационном периоде у всех кроликов в опытных и контрольной группах отмечалось умеренное снижение биоэлектрической активности сетчатки. В 1-е сутки у кроликов из 1-й опытной группы амплитуда а-волны составила $15,9 \pm 1,8$ мкВ, латентность – $19,5 \pm 1,4$ мс, амплитуда b-волны – $37,1 \pm 4,2$ мкВ, латентность – $49,4 \pm 1,3$ мс. У кроликов из 2-й опытной группы амплитуда а-волны – $15,3 \pm 1,9$ мкВ, латентность – $19,8 \pm 1,6$ мс, амплитуда b-волны – $36,2 \pm 4,5$ мкВ, латентность – $49,9 \pm 1,5$ мс. У кроликов из контрольной группы амплитуда а-волны – $16,6 \pm 1,7$ мкВ, латентность – $18,7 \pm 1,3$ мс, амплитуда b-волны – $38,8 \pm 3,5$ мкВ, латентность – $48,4 \pm 1,2$ мс. Такие показатели свидетельствуют об умеренном повреждении сетчатки вследствие операционной травмы. Согласно литературным данным такое снижение биоэлектрической активности нейросенсорной сетчатки в раннем послеоперационном периоде после трансплантации РПЭ является допустимым [21].

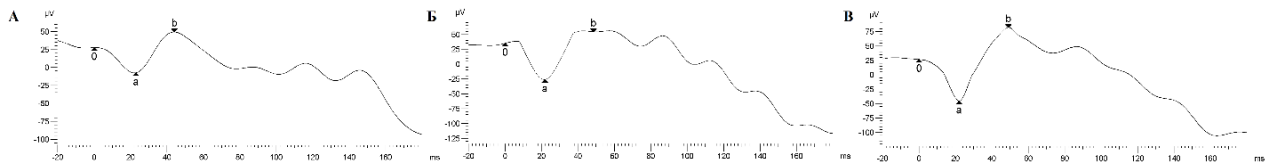
В последующие сроки наблюдения во всех группах отмечали постепенное восстановление биоэлектрической активности нейросенсорной сетчатки к исходным значениям. Динамика электроретинографических показателей представлена в таблице 13. Наиболее быстрое восстановление электроретинографических показателей к исходным отмечали в контрольной группе – к 14 дню амплитуда а-волны составила $44,5 \pm 4,1$ мкВ, латентность – $18,7 \pm 1,3$ мс и амплитуда b-волны – $85,9 \pm 7,4$ мкВ, латентность – $49,2 \pm 1,2$ мс. Восстановление биоэлектрической активности сетчатки в 1-й и 2-й опытных группах происходило к 20-м и 30-м суткам соответственно и составило: 1-я опытная группа: амплитуда а-волны – $44,1 \pm 4,1$ мкВ, латентность – $18,9 \pm 1,4$ мс, амплитуда b-волны – $84,8 \pm 7,7$ мкВ, латентность – $48,7 \pm 1,5$ мс; 2-я опытная группа: амплитуда а-волны – $43,6 \pm 3,9$ мкВ,

латентность – $18,8 \pm 1,5$ мс, амплитуда b-волны – $83,6 \pm 7,2$ мкВ, латентность – $49,5 \pm 1,8$ мс.

В последующие сроки наблюдения электроретинографические показатели сетчатки у всех кроликов оставались стабильными.

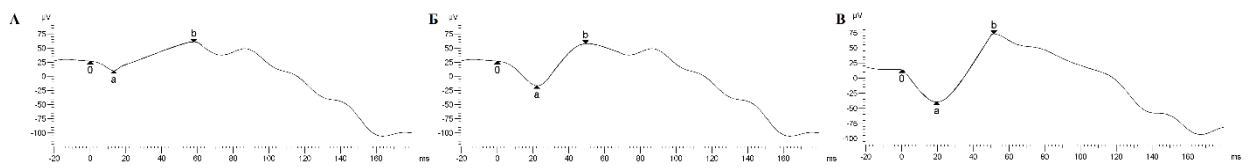
Таблица 13 – Электроретинографические показатели кроликов в динамике в послеоперационном периоде

Группы Сутки, кол-во кроликов - n	Динамика «а» и «b»-волн, мкВ					
	1-я опытная группа		2-я опытная группа		Контрольная группа	
	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна	а-волна	б-волна
1, n=30	15,9±1,8	37,1±4,2	15,3±1,9	36,2±4,5	16,6±1,7	38,8±3,5
3, n=27	20,9±2,2	45,3±4,6	19,3±2,1	42,6±4,7	24,8±2,6	49,1±4,6
7, n=24	25,9±2,8	56,6±5,0	24,6±2,3	50,5±4,9	32,6±3,1	61,8±5,8
10, n=21	32,4±3,3	65,9±5,6	30,6±2,9	58,2±5,1	39,6±4,0	72,3±6,5
14, n=18	38,9±3,5	72,8±6,9	34,3±3,2	66,3±5,5	44,5±4,1	85,9±7,4
20, n=15	44,1±4,1	84,8±7,7	37,8±3,9	73,1±6,6	44,7±4,2	84,8±7,2
30, n=12	45,2±4,3	86,2±7,5	43,6±3,9	83,6±7,2	43,9±4,0	86,2±7,1
60, n=9	43,9±4,4	85,3±7,4	44,9±4,2	85,6±7,4	45,8±4,2	85,4±7,3
90, n=6	46,1±4,0	85,9±7,2	45,3±4,1	86,1±7,3	45,1±4,1	86,8±7,8



а – 1-е сутки; б – 7-е сутки; в – 20-е сутки

Рисунок 34 – Электроретинографические показатели кролика из 1-й опытной группы в послеоперационном периоде



а – 1-е сутки; б – 7-е сутки; в – 30-е сутки

Рисунок 35 – Электроретинографические показатели кролика из 2-й опытной группы в послеоперационном периоде

Таким образом, в ходе проведения электроретинографического исследования кроликов после субретинальной трансплантации 3D сфероидов РПЭ было показано, что предложенная хирургическая техника вызывает умеренное снижение биоэлектрической активности нейросенсорной сетчатки в послеоперационном периоде, однако, данные изменения являются обратимыми, а сроки полного восстановления функционального состояния сетчатки напрямую связаны с количеством трансплантируемого клеточного материала.

5.3 Результаты оптической когерентной томографии

С целью оценки толщины сетчатки и архитектоники ее слоев, а также попытки визуализации клеточных трансплантатов всем кроликам в послеоперационном периоде выполняли ОКТ.

За норму толщины сетчатки были приняты показатели, полученные до проведения оперативного вмешательства в аналогичной зоне – 145 ± 5 мкм. Полученные показатели толщины сетчатки являются сопоставимыми с данными литературы [136].

В 1-е сутки после оперативного вмешательства у всех кроликов из опытных и контрольной групп в зоне оперативного вмешательства отмечали наличие локальной плоской отслойки нейросенсорной сетчатки и отек сетчатки. Динамика толщины сетчатки представлена в таблице 14. Ретинотомическое отверстие не визуализировалось ни у одного животного. В опытных группах субретинально обнаруживали округлые конгломераты, диаметром 60-90 мкм – предположительно сфероиды РПЭ. Однако не все клеточные трансплантаты были адгезированы к нативному РПЭ кроликов-реципиентов. По всей видимости сфероиды не успевали адгезироваться за указанный промежуток времени.

На 3-и сутки в опытных группах отмечали уменьшение высоты локальной ОС и толщины сетчатки. Также субретинально визуализировали 3D сфероиды РПЭ округлой формы, адгезированные к нативному РПЭ кроликов-реципиентов. В контрольной группе определяли прилегание сетчатки, толщина также сетчатки уменьшалась.

На 7-е сутки в 1-й опытной группе визуализировали прилегание сетчатки, во 2-й опытной группе высота ОС была значительно меньше и практически не определялась. В обеих опытных группах также субретинально обнаруживали трансплантаты, адгезированные к РПЭ кроликов-реципиентов и имеющие форму, близкую к овальной – т.е. отмечалось уплощение трансплантатов. В контрольной группе сетчатка прилежала. В опытных и контрольной группах также отмечалась резорбция отека сетчатки с положительной динамикой.

На 10-е сутки в опытных группах визуализировали прилегание сетчатки к сосудистой оболочке, толщина сетчатки приближалась к исходным значениям. Также субретинально обнаруживали уплощенные клеточные трансплантаты овальной формы, визуально отмечалось уменьшение размеров трансплантатов. В контрольной группе сетчатка прилежала, толщина сетчатки практически соответствовала дооперационным данным.

На 14-е сутки у кроликов из опытных групп сетчатка прилежала, ОС в зоне оперативного вмешательства не визуализировалась. Слой РПЭ определялся на томограммах, трансплантаты не визуализировались. Толщина сетчатки уменьшалась. Сетчатка кроликов из контрольной группы выглядела интактно, толщина соответствовала исходным значениям, ОС не визуализировалась.

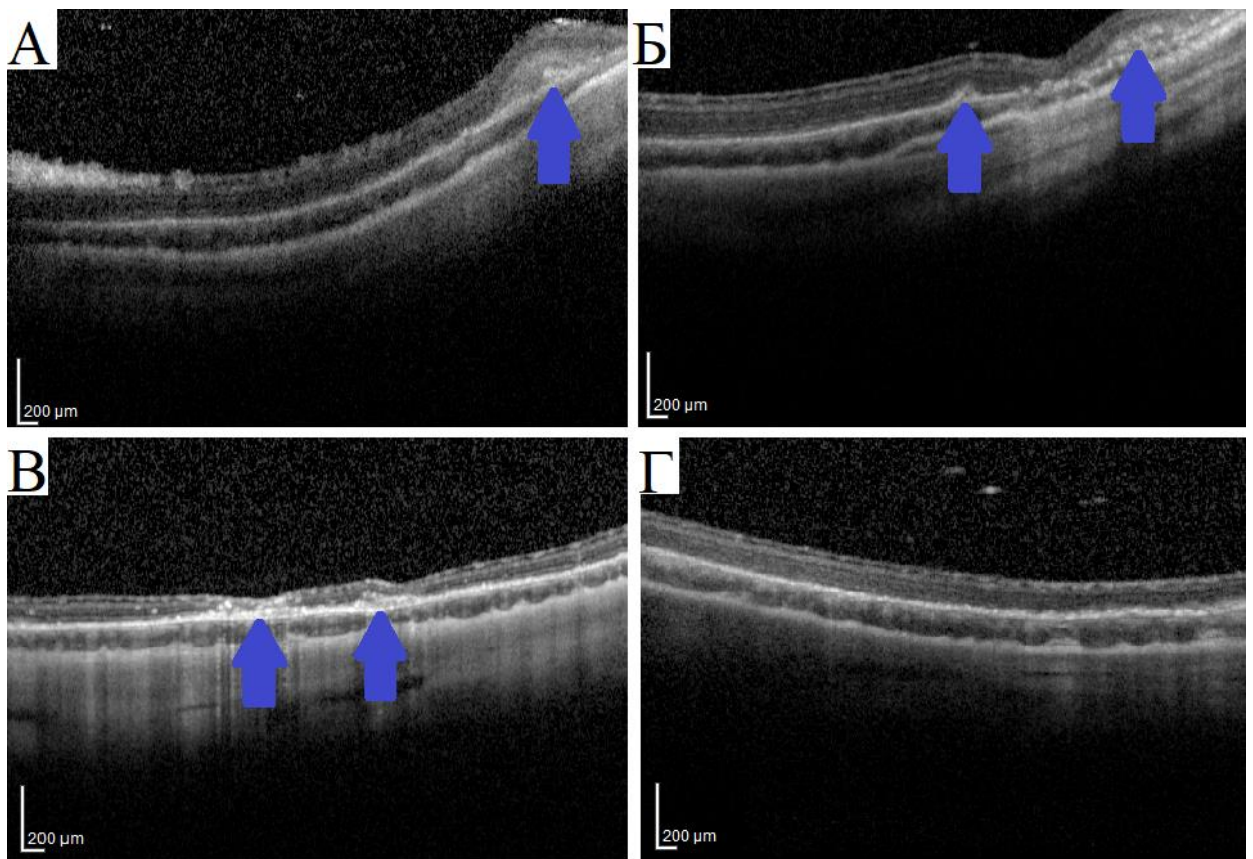
В последующие сроки наблюдения во всех группах с помощью ОКТ не было выявлено значимых морфологических изменений сетчатки – отмечалось прилегание сетчатки, отек сетчатки не визуализировался, дегенеративных изменений фоторецепторов не наблюдалось ни в одном случае.

В 1-й и 2-й опытных группах толщина сетчатки вернулась к исходным значениям на 20-е и 30-е сутки соответственно.

Таблица 14 – Динамика толщины сетчатки кроликов после оперативного вмешательства по данным оптической когерентной томографии

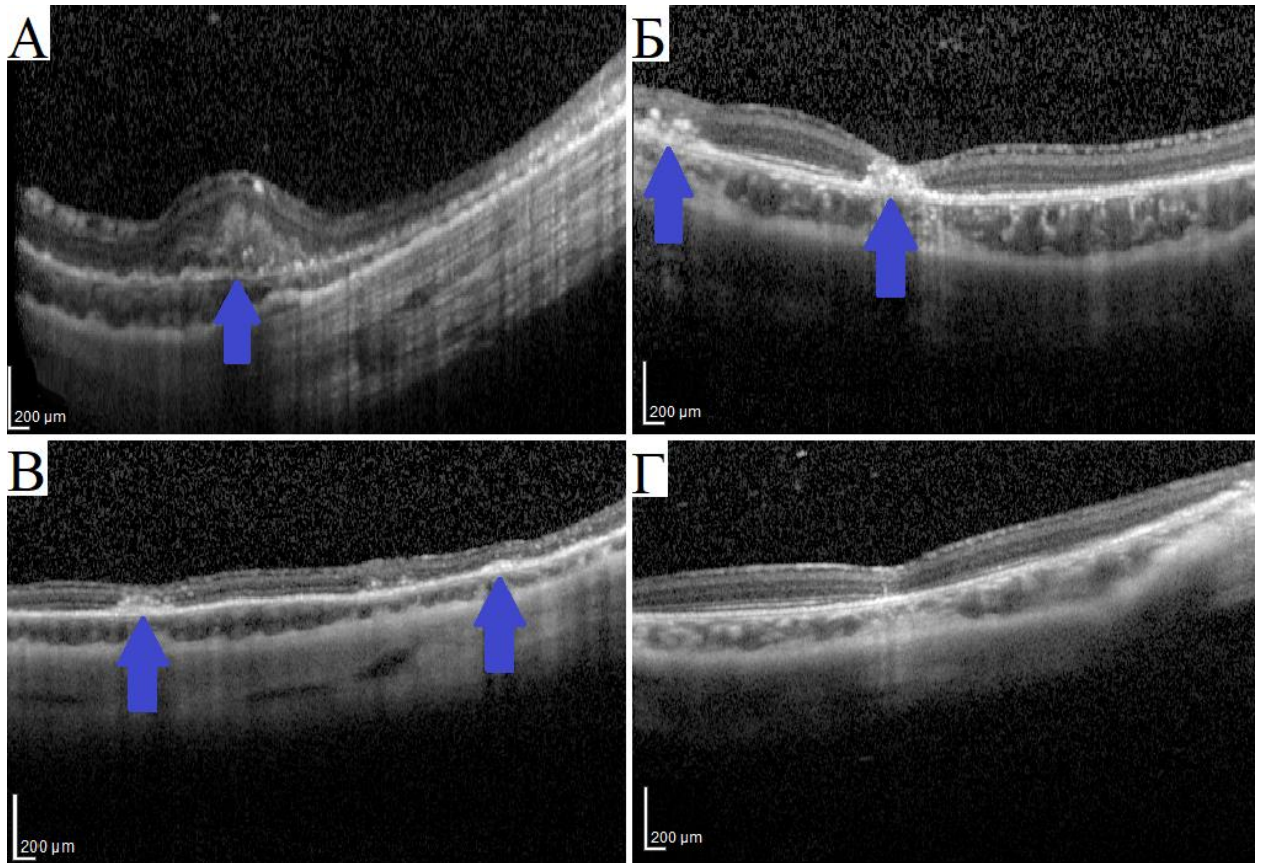
Группы Сутки, кол-во кроликов - n	Толщина сетчатки, мкм		
	1-я опытная группа	2-я опытная группа	Контрольная группа
1, n=30	302 ± 28	332 ± 30	254 ± 21

3, n=27	265 ± 25	289 ± 26	219 ± 17
7, n=24	219 ± 18	240 ± 21	174 ± 12
10, n=21	176 ± 13	202 ± 18	146 ± 5
14, n=18	143 ± 4	181 ± 11	147 ± 6
20, n=15	145 ± 5	144 ± 5	146 ± 5
30, n=12	143 ± 4	143 ± 5	144 ± 5
60, n=9	145 ± 5	145 ± 4	146 ± 4
90, n=6	142 ± 4	144 ± 5	143 ± 5



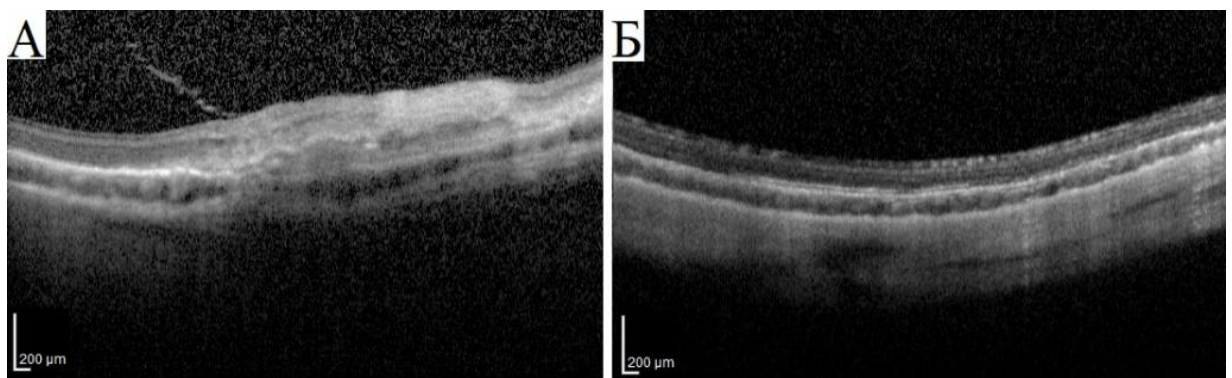
а – 1-е сутки; б – 3-и сутки; в – 7-е сутки; г – 10-е сутки

Рисунок 36 – ОКТ сетчатки кролика после оперативного вмешательства, 1-я опытная группа. Трансплантаты РПЭ указаны стрелками



а – 1-е сутки; б – 3-и сутки; в – 7-е сутки; г – 14-е сутки

Рисунок 37 – ОКТ сетчатки кролика после оперативного вмешательства, 1-я опытная группа. Трансплантаты РПЭ указаны стрелками



а – 1-е сутки; б – 7-е сутки

Рисунок 38 – ОКТ сетчатки кролика после оперативного вмешательства, контрольная группа

Таким образом, в ходе проведения ОКТ сетчатки кроликов, было показано, что предложенная хирургическая техника позволяет доставить 3D

сфероиды РПЭ субретинально, а осложнения (локальная плоская ОС, отек сетчатки), возникающие в раннем послеоперационном периоде, являются биологически безопасными и обратимыми. Также, было показано, что 3D сфероиды РПЭ адгезируются к нативному РПЭ кроликов-реципиентов и, впоследствии, уплощаются и распластываются, что способствует образованию нового клеточного слоя РПЭ.

Во время клинических наблюдений и морфо-функциональных исследований кроликов в послеоперационном периоде посредством УЗ В-сканирования и ОКТ было показано, что такие осложнения, как локальная плоская ОС и отек сетчатки являются обратимыми к 3-м – 7-м суткам. С помощью ЭРГ было доказано, что полное восстановление биоэлектрической активности сетчатки после предложенного оперативного вмешательства происходит к 20-м – 30-м суткам, что свидетельствует о безопасности предложенной хирургической техники. Было показано, что скорость восстановления анатомо-функционального состояния сетчатки зависит от количества трансплантируемых сфероидов. Явления, описанные при биомикроскопии (гиперемия конъюнктивы в зонах разрезов) и офтальмоскопии (воздух в витреальной полости, отек и локальная плоская ОС в зоне введения трансплантатов) являются физиологическими в ответ на операционную травму и обратимыми, что также свидетельствует о безопасности трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов с помощью разработанной хирургической техники.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современной офтальмологии существует множество способов лечения ВМД, таких, как: метаболическая терапия биодобавками, витаминами и полипептидными комплексами, интравитреальное введение ингибиторов неоангиогенеза, фотодинамическая терапия, хирургическое удаление фиброваскулярных мембран, транслокация макулы, а также сочетание вышеперечисленных методик. Однако, данные методики не всегда способствуют значимому улучшению зрительных функций, могут являться дорогостоящими, относительно часто сопровождаются осложнениями, а ВМД по-прежнему продолжает являться одной из ведущих причин необратимой слепоты во всем мире [1, 2, 6, 7, 11, 17, 25, 58, 129].

Первичным звеном в патогенезе развития ВМД является дисфункция РПЭ. Поэтому, в последние 30 лет, перспективным методом лечения ВМД, находящемся на стыке фундаментальной и клинической офтальмологии, является субретинальная трансплантация РПЭ, позволяющая влиять на первопричину развития ВМД [4, 28, 48, 70, 108].

При анализе доступных источников литературы было выявлено, что современные методики трансплантации РПЭ имеют ряд недостатков, связанных травматичностью вмешательства, высоким риском осложнений и трансформацией трансплантатов в мезенхимальную ткань. Все эти недостатки могут приводить к низким функциональным и анатомическим результатам в послеоперационном периоде [3, 20, 43, 67, 74, 89, 96, 131]. Была выдвинута обоснованная гипотеза о том, что субретинальная трансплантация РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов эндовитреальным доступом через ретинопунктурное отверстие позволит решить вышеперечисленные проблемы. В связи с необходимостью проведения доклинических исследований были сформулированы цели и задачи настоящего исследования.

Целью исследования явилась разработка технологии предоперационной подготовки и техники трансплантации 3D клеточных сфероидов аллогенного РПЭ в опыте на животных (кролики).

Для решения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Разработать метод конструирования трансплантатов 3D клеточных сфероидов из аллогенного ретинального пигментного эпителия кроликов.

2. Разработать хирургическую технику субретинальной трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте *in vivo*.

3. Провести морфологическое исследование внутриглазных оболочек кроликов после трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия с помощью гистологического исследования.

4. Провести клинико-морфологическое обоснование безопасности техники трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия с помощью биомикроскопии, офтальмоскопии и ультразвукового (УЗ) В-сканирования.

5. Изучить клинико-морфологическое состояние сетчатки кроликов после трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия с помощью оптической когерентной томографии.

6. Исследовать функциональное состояние нейросенсорной сетчатки кроликов после трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия посредством электроретинографии.

Исследование проводилось в два этапа – *in vitro* и *in vivo*, соответственно поставленным задачам.

На первом этапе проводили выделение РПЭ из глазных яблок (n=20) кроликов-доноров, используя модифицированную технику препарирования

глазного яблока «закрытого» типа – без вскрытия витреальной полости, с последующим 2D культивированием с использованием среды, содержащей: DMEM/F12 (78% – 1-я опытная группа; 88% – 2-я контрольная группа), FBS (20% – 1-я опытная группа; 10% – 2-я контрольная группа), Глутамакс (1%) и раствор антибиотиков (1%).

Через 14 дней после начала культивирования было получено $8,71 \times 10^6$ клеток РПЭ 1-го пассажа в 1-й опытной группе и $2,29 \times 10^6$ во 2-й контрольной группе. Было доказано, что удвоенное количество ростовых факторов в питательной среде достоверно способствует ускорению митоза клеток РПЭ ($p < 0,05$).

Для подтверждения фенотипа полученных 2D клеточных культур проводили иммуноцитохимическое окрашивание эпителиальными маркерами PRE-65, ZO-1, цитокератином 8,18 и мезенхимальным маркером виментином. Проведенное исследование подтвердило эпителиальный фенотип исследуемых клеточных культур и доказало, что удвоенное количество ростовых факторов в питательной среде не способствует ЭМТ клеток РПЭ, что не подтвердило литературные данные [98]. Следовательно, 20%-я концентрация FBS в питательной среде для 2D культивирования РПЭ является приемлемой.

Из полученных 2D культур РПЭ формировали 3D культуры с использованием 81-луночных агарозных планшетов в расчете 1000 клеток на 1 сфероид. Было выявлено, что полное формирование сфероидов РПЭ происходит в течение 7-и дней. Полученные сфероиды имели округлую и гладкую форму, и оставались таковыми на всех последующих сроках наблюдения. Средний диаметр сфероидов составил $88,8 \pm 9,2$ мкм, что является оптимальным для субретинальной трансплантации при помощи канюль минимально допустимого диаметра – 39G. Указанный диаметр для 3D сфероидов, сконструированных из 1000 клеток РПЭ, является сопоставимым с литературными данными [15].

Для подтверждения фенотипа полученных сфероидов проводили иммуноцитохимическое окрашивание эпителиальными маркерами PRE-65, ZO-1, цитокератином 8, 18 и мезенхимальным маркером виментином. Проведенное исследование подтвердило эпителиальный фенотип полученных трехмерных клеточных культур вплоть до 30-х суток 3D культивирования.

В связи с необходимостью транспортировки донорского материала была изучена жизнеспособность сфероидов после пребывания при температуре +4°C в течение 4-х часов. Оценка жизнеспособности осуществлялась путем изучения адгезивных свойств сфероидов и методом флуоресцентного окрашивания маркером «Live and Dead». Было выявлено сохранение жизнеспособности сфероидов вплоть до 7-х суток наблюдения. Таким образом, были определены оптимальные сроки предтрансплантационного культивирования 3D сфероидов РПЭ.

Второй этап включил в себя трансплантацию полученных клеточных культур 30 кроликам породы «шиншилла» (30 глаз). Операции выполнялись под общим наркозом. Экспериментальные животные были разделены на 3 равные группы – 2 опытные и 1 контрольную. Всем кроликам проводили лимбальную перитомию, в 2 мм от лимба на 2, 8 и 10 часах устанавливали три порта 25G в проекции плоской части цилиарного тела для входа эндовитреального инструментария и инфузионной системы. Фиксировали инфузионную систему, вводили световод, витреотом, выполняли витрэктомию с удалением центральных и задних отделах стекловидного тела. Далее канюлей 25G с острым кончиком 39G делали ретинопунктуру выше места центральной зоны сетчатки. Кроликам из 1-й и 2-й опытных групп субретинально вводили 3D сфериды РПЭ в количестве 81 (10 глаз) и 162 (10 глаз) соответственно. Клеточные культуры трансплантировали в жидкой среде – 50 мкл стерильного физиологического раствора. Животным из контрольной группы субретинально вводили 50 мкл стерильного физиологического раствора. ЭЛК сетчатки вокруг ретинопунктурного отверстия не проводили.

Операции заканчивали аспирацией жидкости из витреальной полости с последующей заменой на стерильный воздух и наложением швов на склеральные и конъюнктивальные разрезы.

В послеоперационном периоде всем экспериментальным животным на 1, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 60 и 90-е сутки проводили биомикроскопию, офтальмоскопию, фоторегистрацию переднего и заднего отрезков глаза, УЗ В-сканирование внутриглазных оболочек, ЭРГ, ОКТ сетчатки и гистологическое исследование энуклеированных глазных яблок.

В 1-е сутки после оперативного вмешательства при биомикроскопии глаза у всех прооперированных кроликов были спокойны, отмечалась умеренная инъекция глазного яблока в зоне проведения хирургического вмешательства, швы конъюнктивы были адаптированы, роговица прозрачная, передняя камера средней глубины, влага передней камеры прозрачная, радужка спокойна, выраженных помутнений хрусталика не наблюдалось. Постепенно, в течение 10-и суток, глаза у всех кроликов успокаивались, швы рассасывались, оптические среды оставались прозрачными и позволяли беспрепятственно визуализировать детали глазного дна на все дальнейшие сроки наблюдения.

При офтальмоскопии у всех кроликов визуализировали бледно-розовый ДЗН с четкими границами, в зоне субретинальной инъекции определялась локальная плоская ОС. Ретинопунктурное отверстие не визуализировали. На 3-и – 7-е сутки во всех случаях отмечалось прилегание оболочек, офтальмоскопическая картина у всех кроликов оставалась стабильной на последующих сроках наблюдения.

По данным УЗ В-сканирования в 1-е сутки у всех кроликов визуализировали локальную плоскую ОС (1-я опытная группа – $0,34 \pm 0,03$ мм, 2-я опытная группа – $0,39 \pm 0,03$ мм, контрольная группа – $0,27 \pm 0,02$ мм) в зоне введения клеточных трансплантатов, уровень воздуха составлял $1/3 - 1/2$

объема объема витреальной полости. На 3-и сутки у всех кроликов из опытных и контрольной групп визуализировали прилегание оболочек. Содержимое витреальной полости было акустически прозрачным, внутриглазные оболочки выглядели интактно. Дальнейшее проведение В-сканирования не выявило значимых изменений внутриглазных оболочек у всех кроликов.

За норму электроретинографических показателей были приняты данные, полученные до оперативного вмешательства: амплитуда а-волны – $45,8 \pm 4,2$ мкВ, латентность – $18,2 \pm 1,3$ мс, и амплитуда b-волны – $86,3 \pm 7,3$ мкВ, латентность – $48,7 \pm 1,2$ мс. Полученные показатели дооперационной ЭРГ у кроликов являются сопоставимыми с литературными данными [22]. По данным электроретинографии на 1-е сутки после проведения оперативного вмешательства у всех кроликов отмечали снижение биоэлектрической активности сетчатки, связанное с операционной травмой (1-я опытная группа – амплитуда а-волны - $15,9 \pm 1,8$ мкВ, латентность - $19,5 \pm 1,4$ мс, амплитуда b-волны - $37,1 \pm 4,2$ мкВ, латентность - $49,4 \pm 1,3$ мс. 2-я опытная группа – амплитуда а-волны – $15,3 \pm 1,9$ мкВ, латентность - $19,8 \pm 1,6$ мс, амплитуда b-волны - $36,2 \pm 4,5$ мкВ, латентность - $49,9 \pm 1,5$ мс. Контрольная группа – амплитуда а-волны - $16,6 \pm 1,7$ мкВ, латентность - $18,7 \pm 1,3$ мс, амплитуда b-волны - $38,8 \pm 3,5$ мкВ, латентность - $48,4 \pm 1,2$ мс). Согласно литературным данным, такое снижение биоэлектрической активности нейросенсорной сетчатки в раннем послеоперационном периоде после трансплантации РПЭ является допустимым и свидетельствуют об умеренном повреждении сетчатки вследствие операционной травмы [22]. По мере увеличения сроков наблюдения функциональное сетчатки восстанавливалось и возвращалось к нормальным исходным значениям к 20-м суткам в 1-й опытной группе (амплитуда а-волны – $44,1 \pm 4,1$ мкВ, латентность – $18,9 \pm 1,4$ мс, амплитуда b-волны – $84,8 \pm 7,7$ мкВ, латентность – $48,7 \pm 1,5$ мс), 30-м суткам во 2-й опытной группе (амплитуда а-волны – $43,6 \pm 3,9$ мкВ, латентность – $18,8 \pm 1,5$ мс, амплитуда b-волны – $83,6 \pm 7,2$ мкВ, латентность – $49,5 \pm 1,8$ мс) и 14-м

суткам в контрольной группе (амплитуда а-волны – $44,5 \pm 4,1$ мкВ, латентность – $18,7 \pm 1,3$ мс, амплитуда b-волны – $85,9 \pm 7,4$ мкВ, латентность – $49,2 \pm 1,2$ мс). В последующие сроки наблюдения электроретинографические показатели сетчатки у всех кроликов оставались стабильными, что свидетельствовало о незначительной реакции нейросенсорной сетчатки на использованную в работе хирургическую технику субретинальной трансплантации 3D сфероидов РПЭ.

При проведении ОКТ сетчатки кроликам за норму толщины сетчатки были приняты показатели, полученные до проведения оперативного вмешательства в аналогичной зоне – 145 ± 5 мкм. Полученные показатели толщины сетчатки являются сопоставимыми с литературными данными [136]. В 1-е сутки ОКТ картина морфологического состояния сетчатки была схожей у всех экспериментальных животных: в зоне оперативного вмешательства отмечали локальную плоскую ОС в зоне проведения оперативного вмешательства и отек сетчатки (1-я опытная группа – 302 ± 28 мкм, 2-я опытная группа – 332 ± 30 мкм, контрольная группа – 254 ± 21 мкм). В опытных группах также субретинально визуализировали округлые конгломераты, диаметром 60-90 мкм – предположительно сфероиды РПЭ, отмечали адгезию большинства трансплантатов к нативному РПЭ кроликов-реципиентов. На 3-и, 7-е и 10-е сутки в опытных группах субретинально также обнаруживали трансплантаты, адгезированные к РПЭ кроликов-реципиентов, по мере увеличения сроков наблюдения форма трансплантатов становилась овальной – т.е. отмечалось уплощение трансплантатов. По мере наблюдения в опытных группах сетчатка прилегала и отек сетчатки резорбировался. У кроликов из 1-й опытной группы на 7-е сутки визуализировали прилегание сетчатки, толщина сетчатки вернулась к исходным значениям к 14-м суткам и составила 143 ± 4 мкм. У кроликов из 2-й опытной группы прилегание сетчатки определяли на 10-е сутки, толщина сетчатки соответствовала дооперационным данным к 20-м суткам и составила 144 ± 5 мкм. У кроликов

из опытной группы на 3-и сутки визуализировали прилегание сетчатки, к 10-м суткам толщина сетчатки соответствовала исходным значениям и составила 146 ± 5 мкм. В последующие сроки наблюдения во всех группах с помощью ОКТ не было выявлено значимых морфологических изменений сетчатки – отмечалось прилегание сетчатки, отек сетчатки не визуализировался, дегенеративных изменений фоторецепторов не наблюдалось ни в одном случае.

Все описанные осложнения после трансплантации 3D сфероидов РПЭ (отек сетчатки, локальная ОС, снижение биоэлектрической активности нейросенсорной сетчатки) являются следствием операционной травмы, что соответствует данным литературы [56, 85, 132, 144]. Следует отметить, что во всех случаях трансплантации РПЭ в форме 3D сфероидов изменения всегда носили обратимый характер, что является преимуществом над методиками трансплантации РПЭ, описанными в литературном обзоре [33, 55, 121] и подтверждает микроинвазивность разработанной хирургической техники.

При световой микроскопии гистологических срезов в течение всего срока наблюдения не было обнаружено патологических изменений внутриглазных структур. Склера имела нормальное строение без каких-либо изменений со стороны коллагеновых волокон. Роговица, радужка и цилиарное тело сохраняли нормальную структуру и целостность. В витреальной полости патологических клеточных элементов обнаружено не было. Во всех отделах на всех сроках исследования архитектоника сетчатки была сохранна: отсутствовали деструктивные изменения, не выявлено каких-либо признаков повреждения фоторецепторов, стратификация слоев не нарушена, пролиферативных изменений отмечено не было. Изменений в ДЗН и центральных сосудах сетчатки не наблюдалось. В 1-е сутки после проведения хирургического вмешательства на всех глазах опытных групп субретинально обнаруживались округлые конгломераты диаметром 50-80 мкм, адгезированные к нативному РПЭ кроликов-реципиентов – предположительно

3D сфероиды РПЭ. Адгезия 3D сфероидов РПЭ является признаком жизнеспособности клеточных трансплантатов. Также в опытных и контрольной группах отмечалось утолщение сетчатки, что является естественной патофизиологической реакцией в ответ на операционную травму. На 1-е, 3-и и 7-е сутки на всех глазах опытных групп также субретинально были обнаружены трансплантаты, адгезированные к нативному РПЭ и имеющие тенденцию к уплощению, что свидетельствовало о начале процесса спрединга. Утолщение сетчатки по-прежнему сохранялось во всех группах. К 10-м суткам на всех глазах опытных и контрольной групп сетчатка выглядела практически интактно, дегенеративных изменений фоторецепторов не было обнаружено, отмечалось прилегание к сосудистой оболочке. Между сетчаткой и хориоидеей визуализировался монослой РПЭ. Таким образом, на микроскопическом уровне было показано, что сфероиды РПЭ, трансплантируемые субретинально по предложенной технологии, являются жизнеспособными, так как адгезируются к нативному РПЭ кроликов-реципиентов и по мере увеличения сроков наблюдения распластываются, что способствует образованию нового клеточного слоя РПЭ. Ни в одном случае 3D сфероиды РПЭ не были обнаружены в витреальной полости, что свидетельствует о том, что клеточные трансплантаты не диссеминируют в витреальную полость. Отсутствие структурных нарушений со стороны оболочек глаза и его внутренних сред является доказательством безопасности субретинальной трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов

Таким образом, можно сделать **заключение**: предложенная технология выделения и культивирования кроличьего РПЭ с последующим конструированием 3D клеточных сфероидов позволяет сохранять эпителиальный фенотип клеток, что подтверждается данными иммуноцитохимических исследований. Разработанная малоинвазивная хирургическая техника трансплантации 3D сфероидов РПЭ является

малоинвазивной, малотравматичной и эффективной, что подтверждается данными ОКТ и гистологическими исследованиями. Осложнения, описываемые в раннем послеоперационном периоде (локальная плоская ОС в зоне проведения оперативного вмешательства, отек сетчатки), являются биологически безопасными и обратимыми, что подтверждается данными ЭРГ.

Предложенные методика трехмерного культивирования РПЭ и хирургическая техника его субретинальной трансплантации являются перспективными для дальнейших экспериментальных исследований с целью внедрения в клиническую практику для лечения форм ВМД, не поддающихся традиционным методикам лечения.

ВЫВОДЫ

1. На основании иммуноцитохимических и гистологических исследований показано, что разработанная технология конструирования 3D клеточных сфероидов из кроличьего ретинального пигментного эпителия позволяет получать трансплантаты определенного диаметра с заданным количеством клеток (1000 клеток ретинального пигментного эпителия в одном сфероиде, средний диаметр сфероида $88,8 \pm 9,2$ мкм), сохранять их фенотип, а также повышать их адгезивные свойства и жизнеспособность *in vitro*, в том числе и после краткосрочной гипотермической консервации в течение 7-и суток.

2. Разработанная модифицированная техника трансплантации ретинального пигментного эпителия в форме 3D клеточных сфероидов проводится в один этап эндовитреальным доступом 25G, является микроинвазивной и малотравматичной, а ретинопунтурное отверстие для введения трансплантатов, выполняемое канюлей с острым кончиком 39G, не требует проведения эндолазерной коагуляции сетчатки в парацентральных отделах.

3. С помощью метода световой микроскопии гистологических срезов внутриглазных оболочек показано, что 3D сфероиды ретинального пигментного эпителия после трансплантации в субретинальное пространство предложенным способом адгезируются к нативному ретинальному пигментному эпителию кроликов-реципиентов в 1-е сутки с последующим образованием нового клеточного слоя к 10-м суткам.

4. Проведенное с помощью биомикроскопии, офтальмоскопии и ультразвукового В-сканирования клиничко-морфологическое обоснование безопасности техники трансплантации ретинального пигментного эпителия в форме 3D сфероидов показало, что наличие локальной плоской отслойки сетчатки высотой до $0,39 \pm 0,03$ мм в месте субретинального введения

клеточных трансплантатов в раннем послеоперационном периоде является обратимым в течение 3-х суток.

5. Разработанная хирургическая техника субретинальной трансплантации ретинального пигментного эпителия в форме 3D сфероидов сопровождается биологически безопасными (отек сетчатки до 332 ± 30 мкм) и обратимыми (до 20-и суток) осложнениями сетчатки, что доказано методом оптической когерентной томографии.

6. Трансплантация 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия является безопасной для функционального состояния нейросенсорной сетчатки, а реактивные изменения (снижение биоэлектрической активности сетчатки – амплитуды а-волны до $15,9 \pm 1,8$ мкВ при латентности $19,5 \pm 1,4$ мс, амплитуды в-волны до $37,1 \pm 4,2$ мкВ при латентности до $49,4 \pm 1,3$ мс) являются обратимыми и нивелируются к 20-м – 30-м суткам после оперативного вмешательства, что доказано данными электроретинографии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для получения однородной суспензии клеток ретинального пигментного эпителия из трупного кроличьего глаза без ее контаминации клеточными и экстрацеллюлярными компонентами сетчатой оболочки и стекловидного тела рекомендуется использовать базисную методику препарирования глазного яблока, частично модифицированную. Производится выкраивание корнео-склерального диска трепаном 7 мм, рассечение склеры тремя меридиональными разрезами спереди назад длиной $2/3$ вдоль глазного яблока, отгибание лепестков склеры с последующим удалением, нанесение трех разрезов на хориоидально-пигментный комплекс. При этом первый круговой разрез выполняется на расстоянии 1 мм от зубчатой линии, а первый меридиональный разрез – в любом меридиане в направлении от первого разреза спереди назад к культе диска зрительного нерва; второй круговой разрез – на расстоянии 1 мм от культи зрительного нерва с последующим отделением хориоидально-пигментного комплекса от нейросенсорной сетчатки пинцетом и укладыванием на дно стерильной чашки Петри клетками ретинального пигментного эпителия вверх и заливкой 2 мл 0,25%-го раствора трипсина.

2. Для конструирования клеточных трансплантатов в виде 3D сфероидов из ретинального пигментного эпителия рекомендуется использовать клеточные 2D культуры 1-го пассажа с последующим перенесением в 81-луночные агарозные планшеты и инкубированием при стандартных условиях (температура 37°C, 5% концентрация CO₂, 100% влажность) в течение 7-и суток. Оптимальным посевным количеством клеток ретинального пигментного эпителия на один сфероид следует считать 1000 клеток.

3. Для трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия рекомендуется проводить микроинвазивную трехпортовую 25G витрэктомию через pars plana, ретинопунктуру канюлей с острым кончиком калибра 39G с последующим введением клеточных культур под сетчатку,

используя устройство для субретинальных инъекций, подключаемое к аппарату для витреоретинальной хирургии. Оперативное вмешательство следует завершать аспирацией жидкости из витреальной полости с последующей заменой на стерильный воздух и наложением швов на склеральные и конъюнктивальные разрезы.

Протокол послеоперационного фармакологического пособия является стандартным после витреоретинальных операций и включает в себя местную антибактериальную и противовоспалительную терапию в течение 2-х недель.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

ВГД – внутриглазное давление

ВМД – возрастная макулярная дегенерация

ДЗН – диск зрительного нерва

ИХЦВРК – иридо-хрусталиково-цилио-витрео-ретикулярный комплекс

МКОЗ – максимально скорректированная острота зрения

ОС – отслойка сетчатки

ПВР – пролиферативная витреоретинопатия

РПЭ – ретикулярный пигментный эпителий

СМ – силиконовое масло

СНМ – субретикулярная неоваскулярная мембрана

СРФ – субретикулярный фиброз

УЗ – ультразвуковой

ХПК – хориоидально-пигментный комплекс

ЦФПМБП – Центр фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем

ЭМТ – эпителиально-мезенхимальная трансформация

ЭРМ – эпиретикулярная мембрана

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭЛК – эндолазеркоагуляция

BSS – *англ.* balanced sterile saline solution, сбалансированный стерильный солевой раствор

DMEM/F12 – *англ.* Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham's F12, смесь питательных сред – среды Игла в модификации Дульбекко и среды Хэма F12 в соотношении 1:1

FBS – *англ.* fetal bovine serum, эмбриональная телячья сыворотка

PBS – *англ.* phosphate buffered saline, фосфатно-солевой раствор

VEGF – *англ.* vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

2D – *англ.* two-dimensional, двухмерный

3D – *англ.* three-dimensional, трехмерный

Конфлуэнтность – слияние клеток в 2D культуре

Спраутинг – *англ.* sprouting, выпускание отростков в разные стороны

Спрединг – *англ.* spreading, распластывание с образованием клеточного слоя

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арсютов Д.Г., Герасимова А.Ю. Дифференцированный подход к хирургическому лечению рубцовой стадии СНМ. Современные технологии в офтальмологии // 2014. – №1. – 14 с.
2. Балашова Л.М. Витаминно-минеральные комплексы и здоровье глаз. Русский медицинский журнал. Клиническая офтальмология // 2008. – Т.9. № 1. – С. 41-45.
3. Бикбов М.М., Файзрахманов Р.Р. Оперативное лечение пациентов с фиброваскулярными мембранами при макулярной дегенерации с частичным восстановлением пигментного эпителия сетчатки // Современные технологии в офтальмологии. 2017. – №1. – С. 35-38.
4. Бойко, Э.В. Возрастная макулярная дегенерация (факторы риска, классификация, диагностика, профилактика, лечение): методические рекомендации / Э.В. Бойко, Л.В. Журавлева, С.В. Сосновский – М., 2010. – С. 71.
5. Борзенко С.А. Разработка технологии предоперационной подготовки аллогенного ретинального пигментного эпителия методом трехмерного клеточного культивирования для трансплантации / Борзенко С.А., Попов И.А., Островский Д.С., Кошелева А.В., Зурина И.М., Сабурова И.Н. // Сб. науч. трудов по материалам конференции «Актуальные проблемы офтальмологии 2014». — М., 2014. — С. 163.
6. Володин, П.Л. Фотодинамическая терапия с фотосенсибилизатором хлоринового ряда в офтальмологии (экспериментально-клиническое исследование) автореф. дис. ... докт. мед наук: 14.00.19, 14.00.08 / Володин Павел Львович. – Обнинск, 2008. – 35 с.
7. Захаров, В.Д. Витреоретинальная хирургия / В.Д. Захаров. – М.: Медицина, 2003. – С. 159-164.

8. Либман, Е.С. Эпидемиологические характеристики инвалидности вследствие основных форм макулопатий / Е.С. Либман, Р.А. Толмачев, Е.В. Шахова // Макула. – 2006. – С. 15.
9. Миргородская, С.А. Разработка технологии фиксации изолированных клеток при субретинальной трансплантации: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07, 14.01.24 / Миргородская Светлана Александровна – М., 2014. – 23 с.
10. Островский, Д.С. Разработка способов конструирования искусственной роговицы на основе 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.03, 14.01.24 / Островский Дмитрий Сергеевич – М., 2018. – 23 с.
11. Патент 2274436 Российская Федерация МПК А 61 N 5/067, А 61 К 31/409, А 61 F 98 Способ фотодинамической терапии хориоидальных неоваскулярных мембран [Текст] / Ю.А. Белый, М.А. Каплан, Д.О. Шкворченко, М.В. Федотова, С.В. Новиков, А.В. Терещенко, П.Л. Володин ; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации. - № 2004128298/14 ; заявл. 23.09.2004 ; опубл. 20.04.2006, Бюл. № 11. – 4 с.
12. Педанова, Е.К. Афлиберцепт в лечении резистентной полипоидной хориоидальной васкулопатии: краткосрочные результаты / Е.К. Педанова, А.В. А.В. Дога, А.М. Майорова, И.М. Горшков, А.А. Воскресенская // Офтальмохирургия. – 2017. – № 4. – С. 38–44.
13. Попов И.А., Борзенко С.А., Сабурин И.Н., Островский Д.С. Реконструкция слоя пигментного эпителия сетчатки при помощи многоклеточных сфероидных микроагрегатов *in vitro* // X Съезд офтальмологов России. Сборник научных материалов. – 2015. – С. 196.
14. Попов И.А., Островский Д.С., Кошелева А.В., Зурина И.М., Сабурин И.Н., Борзенко С.А. Разработка технологии предоперационной

- подготовки аллогенного ретинального пигментного эпителия методом трехмерного клеточного культивирования для трансплантации // Актуальные проблемы офтальмологии. – 2014. – №2. – С. 163.
15. Попов, И.А. Предоперационная подготовка аллогенного ретинального пигментного эпителия методом трехмерного клеточного культивирования для трансплантации: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07, 14.01.24 / Попов Илья Андреевич – М., 2016. – 25 с.
16. Репин В.С., Сабурова И.Н., Кошелева Н.В., Горкун А.А., Зурина И.М., Кубатиев А.А. 3D технология сборки и поддержания одиночных дормантных микросфер из 2000 соматических клеток человека с их вторичной репаративной активацией *in vitro* // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2014. — № 3. — С. 161–169.
17. Соломин, В.А. Современные неинвазивные методы диагностики и комбинированное лечение пациентов с субмакулярной неоваскулярной мембраной: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07 / Соломин Владислав Александрович. – М., 2014. – 23 с.
18. Файзрахманов, Р.Р. Система лечебно-диагностических мероприятий у пациентов с различными типами хориоидальной неоваскуляризации при возрастной макулярной дегенерации: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.07 / Файзрахманов Ринат Рустамович. – М., 2015 – 48 с.
19. Хубецова, М.Х. Технология получения сфероидов прогениторных клеток глазного лимба для трансплантации: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07, 14.01.24 / Хубецова Мадина Хетаговна – М., 2017. – 24 с.
20. Abe T., Yoshida M., Tomita H. et al. Auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration: short-term results // *Tohoku J Exp Med.* – 2000. – №191(1). – С. 7-20.
21. Abe T., Yoshida M., Tomita H. et al. Functional analysis after auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration // *Tohoku J Exp Med.* – 1999. – №189(4). – С. 295-305.

22. Abrishami M., Zarei-Ghanavati S., Soroush D. et al. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (avastin) for intravitreal administration // *Retina*. – 2009. – №29. – C. 699-703.
23. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8 // *Arch Ophthalmol*. – 2001. – №119(10). C. 1417-36.
24. Age-Related Eye Disease Study Research Group. The Age-Related Eye Disease Study: a clinical trial of zinc and antioxidants Age-Related Eye Disease Study Report No. 2 // *J Nutr*. 2000. – №130(5S Suppl). – C. 1516-19.
25. Age-Related Eye Disease Study Research Group. The Age-Related Eye Disease Study (AREDS): design implications. AREDS report no. 1 // *Control Clin Trials*. – 1999. – №20(6). – C. 573-600.
26. Alexander P., Thomson H.A., Luff A.J. et al. Retinal pigment epithelium transplantation: concepts, challenges, and future prospects // *Eye (Lond)*. – 2015. – №29(8). – C. – 992-1002.
27. Algvare P.V., Berglin L., Gouras P. et al. Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. – 1994. – №232(12). – C. 707-16.
28. Bhutto I., Luty G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex // *Mol Aspects Med*. - 2012. - №33(4). – C. 295-317.
29. Björkerud S., Björkerud B., Joelsson M. Structural organization of reconstituted human arterial smooth muscle tissue // *Arterioscler Thromb*. – 1994. – №14(4). – C. 644-51.
30. Boxberger H.J., Meyer T.F., Grausam M.C. et al. Isolating and maintaining highly polarized primary epithelial cells from normal human duodenum for

- growth as spheroid-like vesicles // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 1997. – №33(7). – C. 536-45.
31. Boxberger H.J., Sessler M.J., Maetzel B. et al. Highly polarized primary epithelial cells from human nasopharynx grown as spheroid-like vesicles // *Eur J Cell Biol.* – 1993. – №62 (1). – C. 140-51.
32. Bressler N.M. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials – TAP report 2 // *Archives of Ophthalmology.* – 2001. – Vol. 119. – № 2. – C. 198–207.
33. Bridges M.A., Walker D.C., Harris R.A. et al. Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids: polarcyst-like model tissues // *Biochem Cell Biol.* – 1991. – №69(2-3). – C. 102-108.
34. Cai J., Nelson K.C., Wu M. et al. Oxidative damage and protection of the RPE // *Prog Retin Eye Res.* – 2000. – №19(2). – C. 205-21.
35. Caramoy A. A reply to human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation: outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomised clinical study // *Br J Ophthalmol.* – 2011. – №95(3). – C. 431-39.
36. Caramoy A., Fauser S., Kirchhof B. Retinal stimuli can be restored after autologous transplant of retinal pigment epithelium and choroid in pigment epithelium tears // *Acta Ophthalmol.* – 2011. – №89(6). – C. 490-5.
37. Caramoy A., Liakopoulos S., Kirchhof B. Recurrence of choroidal neovascular membrane after autologous transplantation of RPE and choroid for neovascular AMD // *Acta Ophthalmol.* – 2011. – №89(8). – C. 666-78.
38. Caramoy A., Liakopoulos S., Menrath E. et al. Autologous translocation of choroid and retinal pigment epithelium in geographic atrophy: long-term functional and anatomical outcome // *Br J Ophthalmol.* – 2010. – №94(8). – C. 1040-44.
39. Chen M., Luo C., Zhao J. Immune regulation in the aging retina // *Prog Retin Eye.* – 2019. – №69. – C. 159-72.

40. Chen F.K., Patel P.J., Uppal G.S. et al. A comparison of macular translocation with patch graft in neovascular age-related macular degeneration // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2009. – №50(4). – C. 1848-55.
41. Chen F.K., Uppal G.S., MacLaren R.E. et al. Long-term visual and microperimetry outcomes following autologous retinal pigment epithelium choroid graft for neovascular age-related macular degeneration // *Clin Experiment Ophthalmol.* – 2009. – №37(3). – C. 275-285.
42. Chen F.K., Uppal G.S., Rubin G.S. et al. Evidence of retinal function using microperimetry following autologous retinal pigment epithelium-choroid graft in macular dystrophy // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2008. – №49(7). – C. 3143-50.
43. Crafoord S., Geng L., Seregard S. et al. Experimental transplantation of autologous iris pigment epithelial cells to the subretinal space // *Acta Ophthalmol Scand.* – 2001. – №79(5). – C. 509-14.
44. del Cerro M., Humayun M.S., Sadda S.R. et al. Histologic correlation of human neural retinal transplantation // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2000. – №41(10). – C. 3142-8.
45. Del Priore L.V., Ishida O., Johnson E.W. et al. Triple immune suppression increases short-term survival of porcine fetal retinal pigment epithelium xenografts // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2003. – №44(9). – C. 4044-53.
46. Del Priore L.V., Kaplan H.J., Tezel T.H. et al. Retinal pigment epithelial cell transplantation after subfoveal membranectomy in age-related macular degeneration: clinicopathologic correlation // *Am J Ophthalmol.* – 2001. – №131(4). – C. 472-80.
47. Detrick B., Hooks J.J. Immune regulation in the retina // *Immunol Res.* – 2010. – №47(1-3). – C. 153-61.
48. Ding X., Patel M., Chan C.C. Molecular pathology of age-related macular degeneration // *Prog Retin Eye Res.* – 2009. – №28(1). – C. 1-18.
49. Diniz B., Thomas P., Thomas B. et al. Subretinal implantation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells: improved

- survival when implanted as a monolayer // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2013. – №54(7). – C. 5087-96.
50. Durand R.E. Repair during multifraction exposures: spheroids versus monolayers // Br J Cancer Suppl. – 1984. – №6. – C. 203-206.
51. Durand R.E., Sutherland R.M. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage // Exp. Cell. Res. – 1972. – №71(1). – C. 75-80.
52. Durlu Y.K., Tamai M. Transplantation of retinal pigment epithelium using viable cryopreserved cells // Cell Transplant – 1997. – №6(2). – C. 149-62.
53. Eckardt U., Eckardt C. Orthoptic problems after macular rotation with and without muscle surgery // Klin. Monatsbl. Augenheilkd. – 1998. – №4. – C. 212-7.
54. Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results // Ophthalmology. – 2003. – №110(5). – C. 979-86.
55. Eyetech Study Group. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration // Retina. – 2002. – №22(2). – C. 143-52.
56. el Dirini A., Wang H., Ogden T. et al. Retinal pigment epithelium implantation in the rabbit: technique and morphology // Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. – 1992. – №230(3). – C. 292-300.
57. Falkner-Radler C.I., Krebs I., Glittenberg C. et al. Human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation: outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomized clinical study // Br J Ophthalmol. – 2011. – №95(3). – C. 370-5.
58. Fan N.W., Lau L.I., Chen S.J. et al. Comparison of the effect of reduced-fluence photodynamic therapy with intravitreal bevacizumab and standard-fluence alone for polypoidal choroidal vasculopathy // J. Chin. Med. Assoc. – 2014. – Vol. 77. – C. 101-7.

59. Flood M.T., Bridges C.D., Alvarez R.A. et al. Vitamin A utilization in human retinal pigment epithelial cells in vitro // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1983. – №24(9). – C. 1227-35.
60. Flood M.T., Gouras P., Kjeldbye H. Growth characteristics and ultrastructure of human retinal pigment epithelium in vitro // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1980. – №19(11). – C. 1309-20.
61. Folkman J., Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions // *J Exp Med.* – 1973. – №138(4). – C. 745-753.
62. Garbi C., Tacchetti C., Wollman S.H. Change of inverted thyroid follicle into a spheroid after embedding in a collagen gel // *Exp Cell Res.* – 1986. – №163(1). – C. 63-77.
63. Gouras P., Flood M.T., Kjeldbye H. et al. Transplantation of cultured human retinal epithelium to Bruch's membrane of the owl monkey's eye // *Curr Eye Res.* – 1985. – №4(3). – C. 253-65.
64. Gouras P., Tanabe T. Survival and integration of neural retinal transplants in rd mice // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2003. – №241(5). – C. 403-9.
65. Green W.R., Key S.N. Senile macular degeneration: A histologic study // *Trans Am Ophthalmol Soc.* – 1977. – №75. – C. 180.
66. Haab O. Erkrankungen der Macula lutea // *Centralbl prakt Augenheilk.* – 1885. – №9. – C. 383-4.
67. Heussen F.M., Fawzy N.F., Joeres S. et al. Autologous translocation of the choroid and RPE in age-related macular degeneration: 1-year follow-up in 30 patients and recommendations for patient selection // *Eye (Lond).* – 2008. – №22(6). – C. 799-807.
68. Hoem D., Dalen H., Andrén-Sandberg A. et al. Nonadhesive organ culture of human exocrine pancreatic cells with their stroma // *Pancreas.* – 2002. – №25(1). – C. 71-7.
69. Hogan M.J. Role of the retinal pigment epithelium in macular disease // *Trans Am Ophthalmol Otolaryngol.* – 1972. – №76. – C. 64.

70. Humayun M.S., de Juan E.J., del Cerro M. et al. Human neural retinal transplantation // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2000. – №41(10). – C. 3100-6.
71. Hunt R.C., Davis A.A. Altered expression of keratin and vimentin in human retinal pigment epithelial cells in vivo and in vitro // *J Cell Physiol.* – 1990. – №145(2). – C. 187-99.
72. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision,
<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>.
73. Ishida K., Panjwani N., Cao Z. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms // *Ocul Immunol Inflamm.* – 2003. – №11. – C. 91–105.
74. van Meurs J.C., Eter A., Hofland L.J. et al. Autologous peripheral retinal pigment epithelium translocation in patients with subfoveal neovascular membranes // *Br J Ophthalmol.* – 2004. – №88. – C.110-3.
75. Joeres S., Llacer H., Heussen F.M. et al. Optical coherence tomography on autologous translocation of choroid and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration // *Eye (Lond).* – 2008. – №22(6). – C. 782-9.
76. Juel H.B., Faber C., Udsen M.S. et al. Chemokine expression in retinal pigment epithelial ARPE-19 cells in response to coculture with activated T cells // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. – №53(13). – C. 8472-80.
77. Kale S., Biermann S., Edwards C. et al. Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone // *Nat Biotechnol.* – 2000. – №18(9). – C.954-8.
78. Katsen-Globa A., Meiser I., Petrenko Y.A. et al. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds // *J Mater Sci Mater Med.* – 2014. – №25(3). – C.857-71.

79. Keino H., Horie S., Sugita S. Immune Privilege and Eye-Derived T-Regulatory Cells // *J Immunol Res.* – 2018. – №20. – C. 1679 – 97.
80. Kidd G.L., Reddan J.R., Russell P. Differentiation and angiogenic growth factor message in two mammalian lens epithelial cell lines // *Differentiation.* – 1994. – №56(1). – C. 67-74.
81. Knoernschild T., Grasbon T., Wilsch C. et al. RPE cell transplants to non-immune-privileged sites of the eye transform into fibroblast-like cells // *Curr Eye Res.* – 2003. – №27(1). – C. 25-34.
82. Koide N., Sakaguchi K., Koide Y. et al. Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments // *Exp Cell Res.* – 1990. – №186(2). – C.227-35.
83. Konstantinov S.M., Mindova M.M., Gospodinov P.T. et al. Threedimensional bioreactor cultures: a useful dynamic model for the study of cellular interactions // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – №1030. – C. 103-15.
84. Korff T., Augustin H.G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation // *J Cell Biol.* – 1998. – №143(5). – C.1341-52.
85. Kruse P.F. Jr, Miedema E. Production and characterization of multilayered populations of animal cells // *J Cell Biol.* – 1965. – №27(2). – C.273-9.
86. Lai C.C., Gouras P., Doi K. Local immunosuppression prolongs survival of RPE xenografts labeled by retroviral gene transfer // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2000. – №41(10). – C. 3134-41.
87. Lang S.H., Stark M., Collins A. et al. Experimental prostate epithelial morphogenesis in response to stroma and three-dimensional matrigel culture // *Cell Growth Differ.* – 2001. – №12(12). – C. 631-40.
88. Latowsky M.L. Age-related macular degeneration: what can a family physician do? // *CMAJ.* – 1988. – №139(11). – C. 1053-8.

89. Lavail M., Li L., Turner J. Retinal pigment epithelial cell transplantation in RCS rats: normal metabolism in rescued photoreceptors // *Exp Eye Res.* – 1992. – №55(4). – C. 555-62.
90. Lee E., MacLaren R.E. Sources of retinal pigment epithelium (RPE) for replacement therapy // *Br J Ophthalmol.* – 2011. – №95(4). – C. 445-9.
91. Li L., Sheedlo H.J., Turner J.E. Retinal pigment epithelial cell transplants in retinal degeneration slow mice do not rescue photoreceptor cells // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1993. – №34(6). – C. 2141-5.
92. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // *Biotechnol J.* – 2008. – №3(910). – C.1172-84.
93. Lopez R., Gouras P., Brittis M. et al. Transplantation of cultured rabbit retinal epithelium to rabbit retina using a closed-eye method // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1987. – №28(7). – C. 1131-7.
94. Machemer R., Buettner H., Norton E.W. et al. Vitrectomy: a pars plana approach // *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* – 1971. – №75(4). – C. 813-20.
95. Machemer R., Steinhorst U.H. Retinal separation, retinotomy and macular relocation: II. A surgical approach for age-related macular degeneration? // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 1993. – Vol. 231. – C. 635-41.
96. Mac Laren R.E., Uppal G.S., Balaggan K.S. et al. Autologous transplantation of the retinal pigment epithelium and choroid in the treatment of neovascular age-related macular degeneration // *Ophthalmology.* – 2007. – №114(3). – C. 561-70.
97. Macular Photocoagulation Study Group. Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Five-year results from randomized clinical trials // *Arch Ophthalmol.* – 1991. – №109(8). – C. 1109-14.
98. Malm S.W., Amouzougan E.A., Klimecki W.T. Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line // *Toxicol in vitro.* – 2000. – №2. – C. 383-90.

99. Matsuo T., Matsuo N. Reconstruction of trabecular tissue from human trabecular cells as a multicellular spheroid // *Acta Med Okayama*. – 1997. – №51(4). – C. 213-8.
100. Mitchell J., Bradley C. Quality of life in age-related macular degeneration: a review of the literature // *Health Qual Life Outcomes*. – 2006. – №4. – C. 97.
101. Niederkorn J.Y., Wang S. Immune privilege of the eye and fetus: parallel universes? // *Transplantation*. – 2005. – №80(9). – C. 1139-44.
102. Nita M., Strzałka-Mrozik B., Grzybowski A. et al. Ophthalmic transplantology: posterior segment of the eye – part II // *MedSciMonit*. – 2012. – №18(6). – C. 97-103.
103. Nowak J.Z. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy // *Pharmacol Rep*. – 2006. – №58(3). – C. 353-63.
104. Nussenblatt R.B., Liu B., Li Z. Age-related macular degeneration: an immunologically driven disease // *Curr Opin Investig Drugs*. – 2009. – №10(5). – C. 434-42.
105. Pedersen P.S., Holstein-Rathlou N.H., Larsen P.L. et al. Fluid absorption related to ion transport in human airway epithelial spheroids // *Am J Physiol*. – 1999. – №277(6). – C. 1096-103.
106. Petrukhin K. New therapeutic targets in atrophic age-related macular degeneration // *Expert Opin Ther Targets*. – 2007. – №11(5). – C. 625-39.
107. Peyman G.A., Blinder K.J., Paris C.L. et al. A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring // *Ophthalmic Surg*. – 1991. – №22(2). – C. 102-8.
108. Prost M. Transplantation of the retina-the near or distant future? // *Klin Oczna*. – 1992. – №94(5-6). – C. 167-9.
109. Radtke N.D., Aramant R.B., Seiler M.J. et al. Preliminary report: indications of improved visual function after retinal sheet transplantation in

- retinitis pigmentosa patients // *Am J Ophthalmol.* – 1999. – №128(3). – C. 384-7.
110. Radtke N.D., Aramant R.B., Seiler M.J. et al. Vision change after sheet transplant of fetal retina with retinal pigment epithelium to a patient with retinitis pigmentosa // *Arch Ophthalmol.* – 2004. – №122(8). – C.1159-65.
111. Ramsden C.M., Powner M.B., Carr A.J. et al. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future // *Development.* – 2013. – №140(12). – C. 2576-85.
112. Roth F., Bindewald A., Holz F.G. Key pathophysiologic pathways in age-related macular disease // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2004. – №242(8). – C. 710-6.
113. Rixen H., Dyckhoff G., Kaul W. et al. Comparative studies on collagen expression of chondrocytes in monolayer and spheroid culture // *Verh Dtsch Ges Pathol.* – 1990. – №74. – C. 365-7.
114. Sato R., Yasukawa T., Kacza J. et al. Three-dimensional spheroidal culture visualization of membranogenesis of Bruch's membrane and basolateral functions of the retinal pigment epithelium // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2013. – №54(3). – C. 1740-9.
115. Scheider A., Gündisch O., Kampik A. Surgical extraction of subfoveal choroidal new vessels and submacular haemorrhage in age-related macular degeneration: results of a prospective study // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 1999. – №237(1). – C. 10-5.
116. Schütt F., Kopitz J., Yu A. et al. Pathomechanisms for aging of retinal pigment epithelium (RPE) and prophylactic therapy options in regard to AMD // *Klin Monbl Augenheilkd.* – 2008. – №225(6). – C. 548-54.
117. Seitzer U., Gerdes J. Generation and characterization of multicellular heterospheroids formed by human peripheral blood mononuclear cells // *Cells Tissues Organs.* – 2003. – №174(3). – C. 110-6.

118. Sheedlo H.J., Li L.X., Turner J.E. Photoreceptor cell rescue in the RCS rat by RPE transplantation: a therapeutic approach in a model of inherited retinal dystrophy // *Prog Clin Biol Res.* – 1989. – №314. – C. 645-58.
119. Silverman M.S., Hughes S.E. Photoreceptor rescue in the RCS rat without pigment epithelium transplantation // *Curr Eye Res.* – 1990. – №9(2). – C. 183-91.
120. Simó R., Villarroel M., Corraliza L. et al. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood retinal barrier implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy // *J Biomed Biotechnol.* – 2010. – №2010. – C. 190-205.
121. Smith D.T. The Pigmented Epithelium of the Embryo Chick's Eye Studied in vivo and in vitro // *Johns Hopkins Hospital Bulletin.* – 1920. – №31. – C.239-46.
122. Stahl A., Wenger A., Weber H. et al. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – №322(2). – C. 684-92.
123. Stahl A., Wu X., Wenger A. et al. Endothelial progenitor cell sprouting in spheroid cultures is resistant to inhibition by osteoblasts: a model for bone replacement grafts // *FEBS Lett.* – 2005. – №579(24). – C.5338-42.
124. Steinhorst U.H., Amdreae A., Sistani F. Autologous subretinal transplantation of cultivated porcine iris pigment epithelial cells (IPE) // *Klin Monbl Augenheilkd.* – 2001. – №218(3). – C. 192-6.
125. Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System.* Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center. – 2011.
126. Sugita S., Iwasaki Y., Makabe K. et al. Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models // *Stem Cell Reports.* – 2016. – №7(4). – C. 635-48.

127. Takezawa T., Mori Y., Yonaha T. et al. Characterization of morphology and cellular metabolism during the spheroid formation by fibroblasts // *Exp Cell Res.* – 1993. – №208(2). – C. 430-41.
128. Tamiya S., Liu L., Kaplan H.J. Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2010. – № 51(5). – C. 2755-63.
129. Thomas M.A., Dickinson J.D., Melberg N.S. et al. Visual results after surgical removal of subfoveal choroidal neovascular membranes // *Ophthalmology.* – 1994. – №101(8). – C. 1384-96.
130. Thomas M.A., Williams D.F., Grand M.G. Surgical removal of submacular hemorrhage and subfoveal choroidal neovascular membranes // *Int Ophthalmol Clin.* – 1992. – №32(2). – C.173-88.
131. Thumann G., Kirchof B. Transplantation of iris pigment epithelium // *Ophthalmologe.* – 2004. – №101(9). C. 882-5.
132. Toda S., Koike N., Sugihara H. Cellular integration of thyrocytes and thyroid folliculogenesis: a perspective for thyroid tissue regeneration and engineering // *Endocr J.* – 2001. – №48(4). – C. 407-25.
133. Weisz J.M, Humayun M.S, De Juan E.J. et al. Allogenic fetal retinal pigment epithelial cell transplant in a patient with geographic atrophy // *Retina.* – 1999. – №19(6). – C. 540-5.
134. Wongpichedchai S., Weiter J., Weber P. Comparison of external and internal approaches for transplantation of autologous retinal pigment epithelium // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1992. – №33(12). – C. 3341-52.
135. World Health Organization. Vision 2020 The Right to Sight. Global Initiative for the elimination of avoidable blindness. Action plan 2006 – 2011 // World Health Organization. – Geneva, 2007.
136. Xiao-Xu Z., Yan-Ping S., Yu-Xing Z. et al. Induction of Branch Retinal Vein Occlusion by Photodynamic Therapy with Rose Bengal in a Rabbit Model // *Advances in Ophthalmology.* – 2012. – №51. – C. 953-78.

137. Yamaguchi K., Yamaguchi K., Young R.W. et al. Vitreoretinal surgical technique for transplanting retinal pigment epithelium in rabbit retina // *Jpn J Ophthalmol.* – 1992. – №36(2). – C. 142-50.
138. Yannuzzi L.A., Friedman R., Fine S.L. et al. Symposium on age-related macular degeneration // *Bull N Y Acad Med.* – 1988. – №64(9). – C. 955-1013.
139. Zarbin M., Sugino I., Townes-Anderson E. Concise Review: Update on Retinal Pigment Epithelium Transplantation for Age-Related Macular Degeneration // *Stem Cells Transl Med.* – 2019. – №8(5). – C. 466-77.
140. Zhao C., Boles N.C., Miller J.D. et al. Development of a refined protocol for trans-scleral subretinal transplantation of human retinal pigment epithelial cells into rat eyes // *J Vis Exp* – 2017. – №60(10). – C. 542-56.