

ДЛИТЕЛЬНАЯ НОРМОТЕРМИЧЕСКАЯ КОНСЕРВАЦИЯ ЛИМБАЛЬНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И АКТИВНОСТИ ММСК-ПОДОБНЫХ ЛИМБАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Борзенко С.А.¹, Онищенко Н.А.², Тонаева Х.Д.¹, Комах Ю.А.¹, Сускова В.С.², Сусков С.И.², Диденко Л.В.³, Шевлягина Н.В.³, Кост Е.А.³

¹ ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. ак. С.Н. Федорова» Минздравсоцразвития России, г. Москва

² ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России, г. Москва

³ ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России, г. Москва

Повышение надежности приживления трансплантатов роговицы в группе высокого риска может быть достигнуто при сочетанной трансплантации их с консервированными лимбальными трансплантатами. В работе изучено два способа консервации ЛТ: нормотермическая консервация в среде Борзенка–Мороз или стандартной культуральной среде в течение 35 суток и криоконсервация при –80 °С в среде Борзенка–Мороз с добавлением ДМСО и без добавления ДМСО в течение 1 месяца. Установлено, что длительная нормотермическая консервация (в течение 28 суток) и криоконсервация сохраняют жизнеспособность клеток ЛТ, способность поддерживать цитокиновый баланс, а также сохранять фенотип ММСК и активизировать толерогенные свойства лимбальных клеток, что может улучшить качество и повысить надежность приживления трансплантата роговицы без системной иммуносупрессии.

Ключевые слова: лимбальный трансплантат, ММСК-подобные клетки, нормотермическая и низкотемпературная консервация.

LONG-TERM (OF MANY DAYS) NORMOTHERMAL LIMBAL GRAFTS PRESERVATION AS A METHOD OF QUANTITY AND ACTIVITY INCREASE OF MMSC-LIKE LIMBAL CELLS

Borzenok S.A.¹, Onischenko N.A.², Tonaeva Kh.D.¹, Komakh Y.A.¹, Suskova V.S.², Suskov S.I.², Didenko L.V.³, Shevlyagina N.V.³, Kost E.A.³

¹ The S. Fyodorov Eye Microsurgery Complex FSBI

² Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

³ Gamaleya Research Institut for Epidemiology and Microbiology

The reliability increase of corneal transplants engraftment may be achieved by combined transplantation with preserved limbal grafts (LG). We studied two methods of LG preservation: normothermal preservation in Borzenok–Moroz medium or standard culture medium for 35 days and cryopreservation at –80 °C in Borzenok–Moroz medium with/without DMSO addition for 1 month. We found that long-term normothermal preservation (for 28 days) and cryopreservation maintain LG cells viability and their capacity to maintain cytokine balance as well as to keep cytokine balance and to retain phenotype of MMSC (multipotent mesenchymal stromal cells) and to activate tolerogenic properties of limbal cells the latter improving quality and increasing capacity of corneal transplant engraftment reliability without systemic immunosuppression.

Key words: limbal graft, MMSC-like cells, normothermal and low temperature preservation.

Статья поступила в редакцию 09.04.12 г.

Контакты: Тонаева Хадиджат Джанхуватовна, зав. Глазным тканевым банком МНТК «Микрохирургия глаза».

Тел. (499) 488-84-05; (905) 515-66-11, e-mail: tonxd15@gmail.com

Наиболее частой причиной неудовлетворительных результатов пересадки донорской (аллогенной) роговицы является развитие реакции тканевой несовместимости с исходом трансплантата роговицы в стойкое помутнение. По данным разных авторов, помутнение в посттрансплантационном периоде развивается в 5–70% наблюдений в зависимости от исходной этиологии бельма [2, 16].

В настоящее время единственным широко применяемым способом защиты аллогенных трансплантатов служит иммуносупрессивная фармакотерапия. Однако для профилактики помутнения трансплантата роговицы локальное применение препаратов этой группы ограничено отсутствием «глазных лекарственных форм» или их недостаточным терапевтическим действием, а при системном и длительном применении – возникновением ряда побочных эффектов. Следует отметить, что до 46% реципиентов с пересадкой роговицы остаются резистентными к иммуносупрессивной фармакотерапии [1].

В связи с вышеизложенным становится понятным растущий интерес трансплантологов к так называемой малой иммуносупрессивной фармакотерапии [3] и к использованию клеточных технологий, обладающих иммунокорригирующими свойствами [19].

Изучение свойств стволовых/прогениторных клеток костного мозга, и прежде всего мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), позволило установить, что человеческие ММСК слабо экспрессируют HLA-молекулы класса I и не экспрессируют HLA-молекулы класса II, поэтому они не в состоянии запустить активацию эффекторных Т-клеток при аллогенной пересадке [15]. Полагают, что ММСК способны также индуцировать иммунную толерантность, активируя размножение Т-регуляторных клеток и стимулируя секрецию противовоспалительных цитокинов и ростовых факторов [7].

Кроме того, ММСК, являясь клетками костного мозга – центрального органа иммуногенеза, одновременно обеспечивают активацию регенераторных процессов в поврежденных органах, так как способны ингибировать апоптоз, улучшать микроциркуляцию и восстанавливать цитокиновый баланс, который создает условия для ускоренной регенерации поврежденного органа [6].

Известно также, что ММСК при сотрансплантации с донорскими органами и тканями способны благоприятно влиять на приживление аллогенных донорских трансплантатов [5].

Очевидно, это связано с тем, что ММСК костного мозга регуляторно взаимодействуют с аналогами ММСК, которые содержатся в тканевых нишах различных органов и тканей организма. Тканевые ниши, содержащие аналоги ММСК, обеспечивают

интеграцию стволовых/прогениторных клеток и их потомков в структуру ткани, они хорошо снабжены кровеносными сосудами и нервными окончаниями, обеспечивают физиологическую и репаративную регенерацию этих тканей, а также регуляцию местного иммунитета. Примером такой «ниши» являются палисады Фогта в лимбальной зоне глазного яблока.

Лимб анатомически окружен сосудами, обеспечивающими снабжение клеток этой зоны кислородом, питательными веществами и регуляторными пептидами, и таким образом представляет собой нишу для регионарных стволовых клеток роговицы. В 2004 г. впервые было описано присутствие мезенхимальных стволовых/прогениторных клеток в глубоких слоях лимба [17]. Показано, что они обладают фенотипом, сходным с ММСК костного мозга, не несут на своей поверхности антигенов HLA-DR и благодаря своим секреторным свойствам и межклеточным контактам отвечают за процессы самоподдержания пула эпителиальных стволовых/прогениторных клеток и процессы физиологической и репаративной регенерации роговицы [9].

В литературе описано множество способов сотрансплантации стволовых клеток лимба и роговицы при пересадках с высоким риском отторжения и выраженными признаками лимбальной недостаточности. В качестве лимбальных трансплантатов (ЛТ) используют:

- аутооттрансплантаты лимба с билатерального глаза или от близких родственников; недостатком данного способа является невозможность иссечения достаточно большого участка лимба и несогласие многих пациентов на такую процедуру [13];
- аутологичные лимбальные клетки, культивированные на различных носителях; применение данного способа ограничено технической сложностью формирования биоинженерной конструкции и дороговизной его выполнения [11, 14];
- трансплантаты аллогенного лимба от доноров-трупов; метод хотя и позволяет обеспечить расширенное использование донорского материала, однако требует длительной иммуносупрессивной терапии из-за присутствия в структуре нативного лимба не только ММСК-подобных клеток, но и антигенпрезентирующих клеток Лангерганса, запускающих эффекторный иммунный ответ [10].

В связи с иммунологическими проблемами использования аллогенного донорского материала возникает необходимость снижения иммунной реактивности аллогенного лимба.

Показано, что нормотермическая консервация органов и тканей, в частности ЛТ, путем доставки

кислорода, субстратов и элиминации продуктов катаболизма позволяет не только сохранить исходный фенотип клеток трансплантата, но также снизить иммунную реактивность, в частности за счет элиминации клеток Лангерганса из ЛТ, и улучшить качество его приживления [4, 8, 12]. Между тем в имеющейся литературе отсутствуют сведения о влиянии нормотермической консервации на состояние ММСК-подобных клеток в ЛТ, которые прежде всего обеспечивают состояние толерантности окружающих тканей к трансплантату.

Учитывая вышеизложенные проблемы, возникающие при использовании нативных аллогенных ЛТ, мы поставили перед собой задачу изучить возможность снижения иммунной реактивности ЛТ в процессе нормотермической консервации за счет увеличения пула и активности ММСК-подобных клеток в ЛТ, а также оценить пригодность таких трансплантатов для создания криобанка ЛТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из трупного неинфицированного донорского материала, доставленного в Глазной тканевой банк, проводился отбор глазных яблок для выделения лимбальных трансплантатов на основании следующих критериев: посмертный период не более 18 часов, возраст донора – не старше 60 лет, отсутствие грубых морфологических дефектов в тканевых структурах трупного глаза и признаков воспалительного процесса в переднем отрезке глазного яблока с учетом значений критерия жизнеспособности тканей глаза (адреналиновая проба Борзенка – показатели А или В).

Выделение ЛТ осуществлялось в условиях стерильного бокса с трупного глазного яблока, подготовленного для забора донорской роговицы, согласно медицинской технологии «Алгоритм заготовки трупных донорских роговиц человека для трансплантации» (ФГБУ «МНТК «МГ» им. акад. С.Н. Федорова»). После дезэпителизации роговицы и удаления бульбарной конъюнктивы лезвием производились 2 круговых надреза на глубину около 0,5 мм: один – по границе между лимбальной и прозрачной зонами роговицы, другой – отступая на 2 мм в сторону склеры. Далее на ту же глубину, перпендикулярно выполненным надрезам, производились 6 равно удаленных надрезов в сторону роговицы. Затем ножом-расслаивателем отсекался слой ткани на заданной глубине. В результате предложенной техники получают 6 ЛТ, представляющих собой полоски ткани шириной 2 мм и толщиной около 0,5 мм по всей длине, при этой технике не происходит перфорации глазного яблока, что позволяет в последующем выкраивать корнеосклеральный диск для дальнейшей консервации и трансплантации.

Для определения оптимального состава среды и сроков нормотермической консервации ЛТ от 6 доноров-трупов были разделены на 3 группы (по 24 ЛТ в каждой) с последующим изучением морфологических и функциональных изменений в течение 35 суток консервации.

В I группе ЛТ консервировали в среде Борзенка–Мороз (среда 199, декстран 40.000, HEPES 1M, L-глутамин, 7,5% раствор бикарбоната Na, пенициллин, стрептомицин, 40% раствор глюкозы, амфотерицин В, инсулин, дексаметазон, 2% фетальной человеческой сыворотки), которая разрешена для клинического применения на территории РФ [2]; во II группе ЛТ консервировали в стандартной среде для культивирования ММСК (DMEM/F12, HEPES 1M, 10% фетальной бычьей сыворотки, L-глутамин, инсулин, дексаметазон, пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В) [6]; в III группе ЛТ консервировали в культуральной среде, обогащенной ростовыми факторами (DMEM/F12, HEPES 1M, 15% фетальной сыворотки, cholera toxin, EGF, FGF, этаноламин, L-глутамин, инсулин, дексаметазон, гентамицин, амфотерицин В) [20]. Во всех группах эксперимента проводили замену среды на свежую через каждые 3 суток, а также контроль динамики изменений цитокинового баланса в инкубационной среде. Содержание про- и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1RA, IL-4, IL-6, INF γ , TNF α , TGF β) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием отечественных наборов (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург). Для оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток ЛТ на разных сроках консервации проводили морфометрический подсчет количества их в ткани. Для этого готовили гистологические срезы из предварительно фиксированных в 5% растворе формалина ЛТ, залитых в парафин и окрашенных гематоксилин-эозином по стандартной методике. Иммуногистохимическое (ИГХ) выявление экспрессии маркеров толерогенного состояния ткани ЛТ (активация маркеров ММСК-подобного фенотипа и рецепторов HLA-G в клетках) проводили с помощью первичных антител к CD 90, CD 105 (ab 93758, Abcam, UK), виментину (Novocastra, UK) и HLA-G (ab 76869, Abcam, UK); в качестве вторичных антител использовали Goat antimouse, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488.

С целью изучения возможности создания банка криоконсервированных ЛТ от 4 доноров-трупов были отобраны ЛТ, прошедшие стадию нормотермической консервации в течение 28 суток. ЛТ были разделены на 3 группы: в I группе ЛТ замораживали в среде Борзенка–Мороз с использованием криопротектора ДМСО и сыворотки (60% среды Борзенка–Мороз, 30% фетальной сыворотки, 10% ДМСО); во II группе ЛТ замораживали в среде Борзенка–Мо-

роз без ДМСО и сыворотки (негативный контроль); III группа служила контролем, в которой ЛТ сохраняли в среде Борзенка–Мороз при нормотермии без замораживания. Заморозку в I и II группах проводили по программе стандартного замораживания и хранили при -80°C в течение 1 месяца. Размораживание осуществляли на водяной бане с последующим 3-кратным отмыванием ЛТ в среде Борзенка–Мороз. Для определения ультраструктурной сохранности ткани часть ЛТ из каждой группы фиксировали в 5% растворе формалина и заливали парафином по стандартной методике. Далее депарафинизированные срезы ЛТ покрывали слоем золота толщиной 7 нм с помощью напылительной установки SPI-MODULE Sputter Coater (SPI Supplies, USA), монтировали двусторонним скотчем к алюминиевому столику и анализировали с помощью сканирующего электронно-ионного микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, USA). Оставшуюся часть ЛТ подвергали нормотермической консервации в среде Борзенка–Мороз в течение 14 суток. Для определения функциональной сохранности ЛТ проводили контроль динамики изменений содержания про- и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1RA, IL-4, TGF β , IL-6, TNF α , INF γ) в инкубационной среде с помощью твердофазного ИФА и применением отечественных наборов (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург).

Результаты морфометрического подсчета клеток и определения содержания цитокинов были подвергнуты статистической обработке с помощью программы STATISTICA 6.0 с использованием t-критерия по Стьюденту, достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выбора оптимального состава среды и сроков сохранения жизнеспособности ЛТ нами использовался морфометрический метод подсчета клеток в ЛТ в динамике их консервации в течение 35 суток (рис. 1). Было установлено, что в I и II группах (в среде Борзенка–Мороз и стандартной культуральной) имело место практически одинаковое увеличение клеточной массы к 28-м суткам инкубации: с $435 \pm 5,0$ до $722 \pm 5,0$ ($p \leq 0,05$). В третьей группе при использовании консервационной среды, обогащенной ростовыми факторами, к 14-м суткам происходило сначала незначительное увеличение клеточной массы, а затем к 28-м суткам количество клеток в ЛТ резко снижалось до $50 \pm 7,0$, и к 35-м суткам наступала полная элиминация клеток из ЛТ (рис. 2). Сравнительное изучение результатов консервации ЛТ в трех типах консервационных сред показало непригодность состава среды III группы для длительных сроков консервации, и поэтому дальнейшие исследования функции ЛТ из этой группы нами не проводились.

Повышение пролиферативной активности клеток обычно сопровождается изменением состава цитокинов в инкубационной среде, которое выражается в снижении содержания провоспалительных и в повышении противовоспалительных цитокинов. Динамическое изучение цитокинового профиля инкубационной среды в процессе ее замены позволило подтвердить, что при консервации ЛТ в средах I и II групп, в которых имело место повышение пролиферативной активности клеток, происходило повышение содержания противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-1RA, TGF β) и снижение провоспалительных (INF γ , TNF α) (рис. 3). Динамика содержания IL-6 характеризовалась незначительным увеличением, которое может свидетельствовать не столько о провоспалительном состоянии клеток ЛТ в процессе консервации и трансплантации ЛТ, сколько о сохранности и активации ММСК-подобных клеток лимба в недифференцированном состоянии [18].

Подтверждением этого могут служить наши данные об усилении экспрессии маркеров ММСК и HLA-G-рецепторов в клетках ЛТ в процессе нормотермической консервации.

Иммуногистохимическое окрашивание клеток нативных препаратов ЛТ до и на 28-е сутки нормотермической консервации в среде, используемой в I группе, подтвердило не только сохранность лимбальных клеток с фенотипом ММСК, но и выявило увеличение активности маркеров ММСК и HLA-G-рецепторов по сравнению с исходным уровнем.

Использование моноклональных антител для оценки экспрессии маркеров ММСК (CD105, CD90, виментин) и мембрано-цитоплазматический маркер HLA-G-рецепторов в клетках препаратов ЛТ позволили установить низкую экспрессию их (слабое зеленое свечение) в нативных препаратах ЛТ до

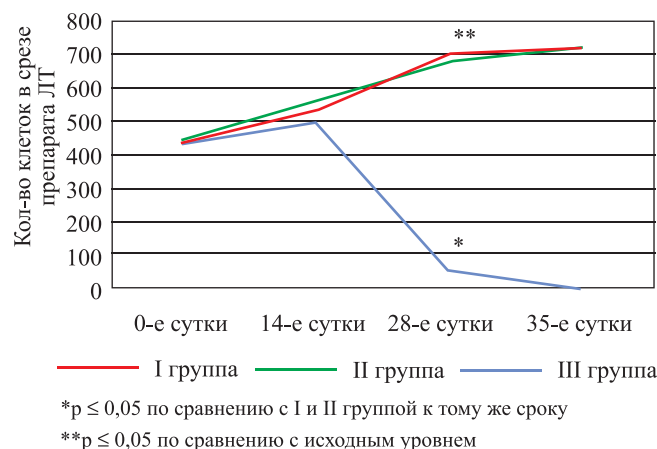


Рис. 1. Результаты морфометрической оценки динамики пролиферации клеток в ткани ЛТ в течение 35 суток нормотермической консервации в 3 группах сред

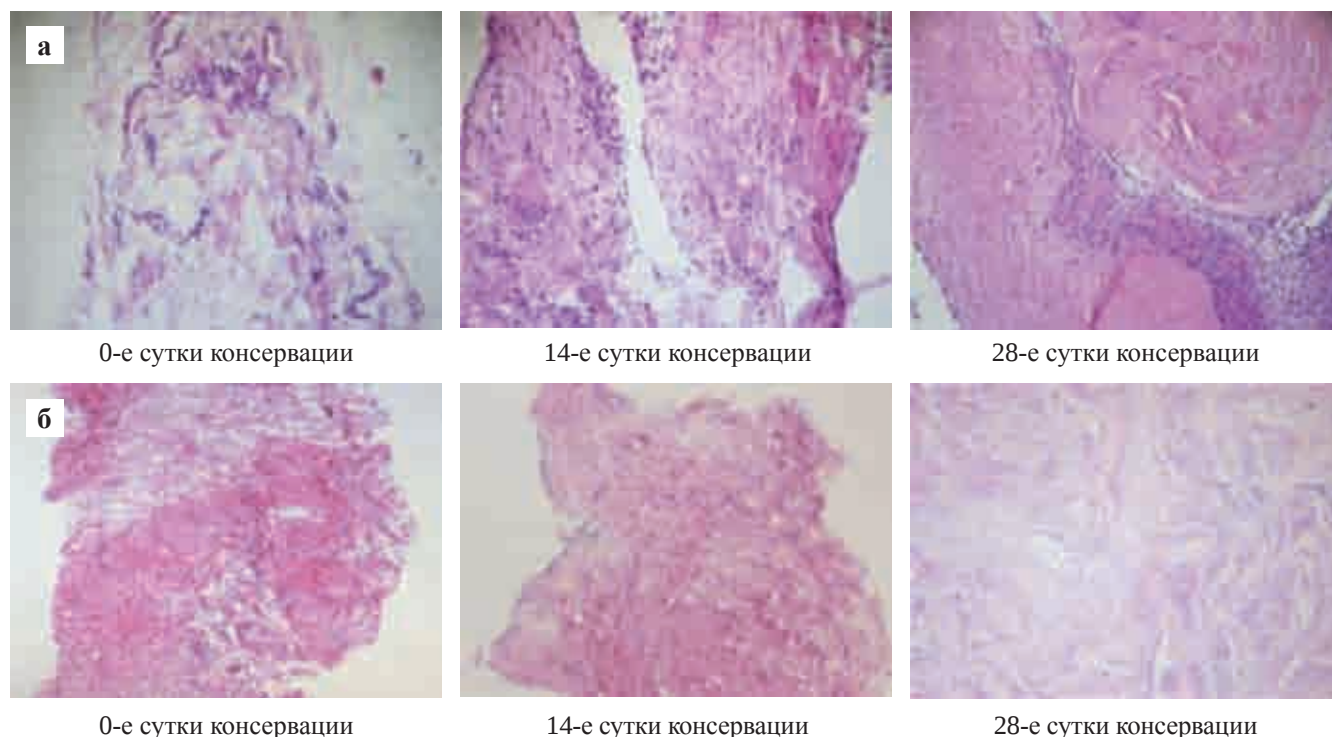


Рис. 2. Световая микроскопия срезов препаратов ЛТ: а – I группа, увеличение массы ядросодержащих клеток в препаратах при увеличении сроков консервации; б – III группа, уменьшение массы ядросодержащих клеток в препаратах по мере увеличения сроков консервации. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$

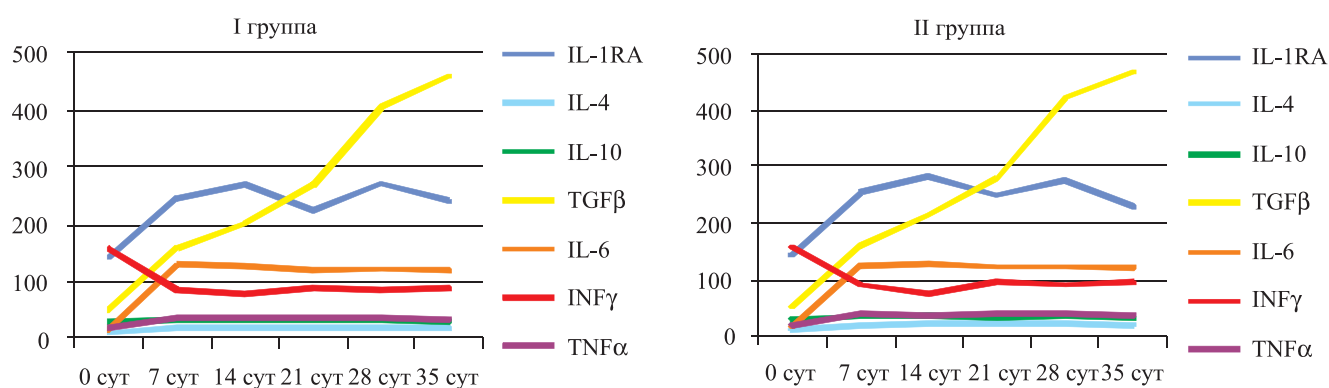


Рис. 3. Динамика содержания цитокинов в инкубационной среде в процессе нормотермической консервации в течение 35 суток, $p \leq 0,05$

консервации (рис. 4) и резкое усиление экспрессии этих маркеров к 28-м суткам консервации (рис. 5), которое происходило на фоне увеличения пролиферативной активности клеток ЛТ.

Способность лимбальных клеток в ЛТ в процессе консервации сохранять фенотип ММСК и HLA-G-рецепторов, присущих клеткам с толерогенными свойствами, а также усиливать их экспрессию указывает на возможность активного участия этих клеток в процессах иммунной регуляции, в том числе в выработке толерантности к трансплантату роговицы при их сотрансплантации.

Таким образом, установленные нами факты подтверждают, что в клетках ЛТ при консервации в

нормотермических условиях в среде Борзенка–Мороз (I группа) и в стандартной культуральной среде (II группа) в течение 28 суток сохраняются не только их жизнеспособность и пролиферативная активность, но также сохраняются и активизируются их «стволовые» и толерогенные свойства, которые наряду с элиминацией клеток Лангерганса из ЛТ в процессе нормотермической консервации [8, 12] должны повысить надежность приживления роговичных трансплантатов без системной иммуносупрессии при сочетанных трансплантациях ЛТ и донорских роговиц, особенно при трансплантациях высокого риска.

Целесообразность сочетанных трансплантаций донорских роговиц и ЛТ после нормотермической

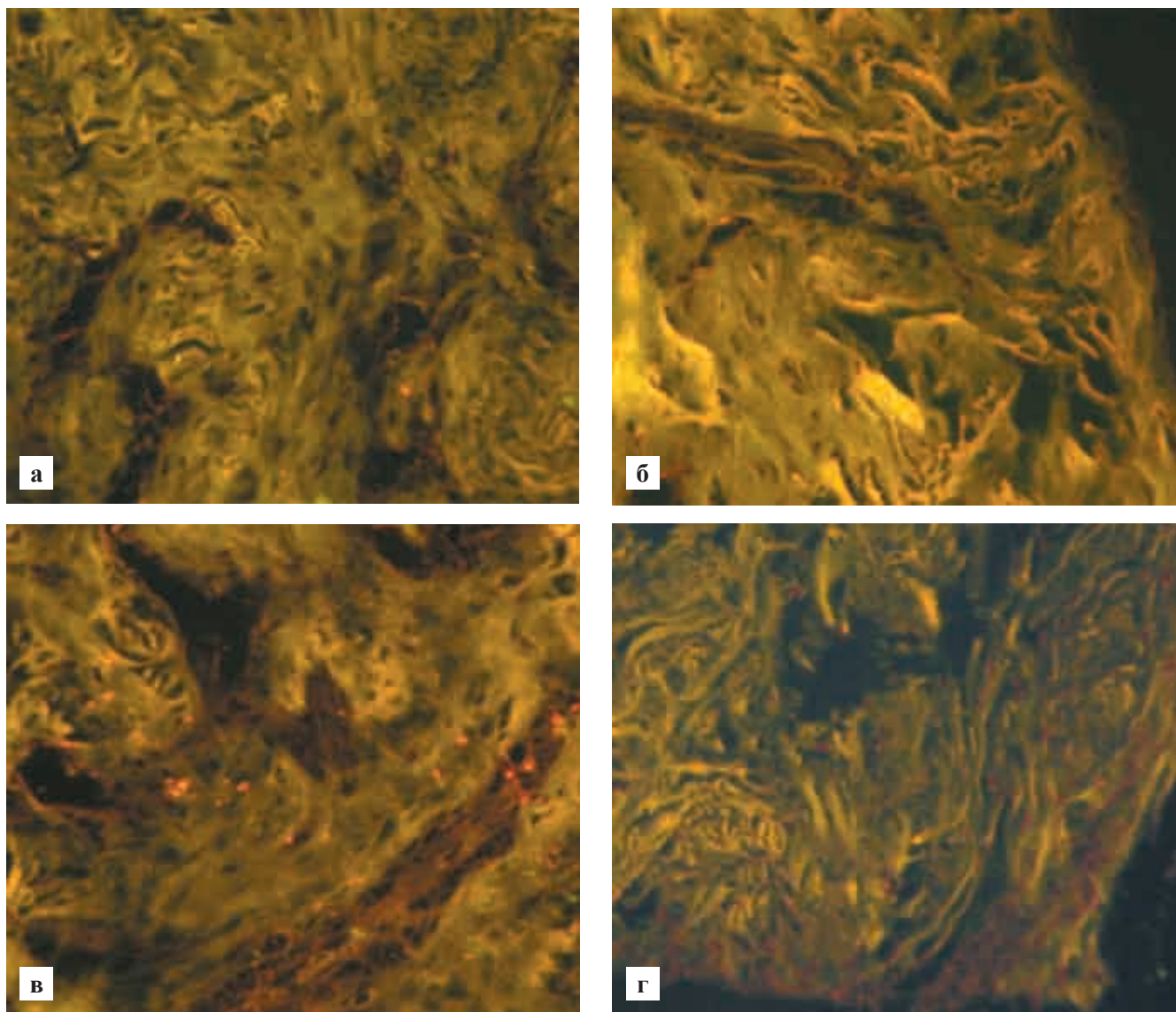


Рис. 4. Препараты нативных ЛТ до консервации. ИГХ-реакция на маркеры MMCK (CD90, CD105, виментин) и HLA-G-рецепторы. Люминесцентная микроскопия; $\times 200$. Выявление слабой ИГХ-реакции (зеленое свечение маркеров) в препаратах ЛТ до консервации: а – препарат ЛТ, окрашенный АТ к CD105; б – препарат ЛТ, окрашенный АТ к виментину; в – препарат ЛТ, окрашенный АТ к CD90; г – препарат ЛТ, окрашенный АТ к HLA-G

консервации делает актуальной проблему заготовки ЛТ в достаточных количествах и хранения невоспаленных в клинике трансплантатов в криобанке ЛТ.

Однако до сих пор не изучены оптимальные среды для криоконсервации ЛТ, прошедших предварительную нормотермическую консервацию. Нами было проведено сравнительное изучение консервационной среды Борзенка–Мороз в составе стандартной среды для криоконсервации клеток с добавлением ДМСО (I группа) и без добавления ДМСО (II группа). Для контроля структурных изменений в ЛТ после криоконсервации использовали ЛТ после 28 суток нормотермической консервации (III группа).

Для оценки изменений, возникающих в ткани ЛТ после процесса замораживания, хранения и размораживания, проводили сканирующую электронную

микроскопию препаратов ЛТ. Результаты исследования показали, что при использовании среды с добавлением криопротектора (ДМСО) в I группе морфологическая структура ЛТ практически не отличалась от структуры ЛТ из III контрольной группы, не подвергавшихся криоконсервации. Ультраструктура ЛТ во II группе без добавления в среду криопротектора характеризовалась расширением пространств между коллагеновыми волокнами, появлением зон деструктурированного коллагена, а также набуханием и разрушением клеток ЛТ (рис. 6).

Полученные данные явились основанием для продолжения изучения функциональных возможностей клеток ЛТ, криоконсервированных только в I группе, и прекращения дальнейших исследований ЛТ из II группы, так как отмечалась выраженная деградация их ткани.

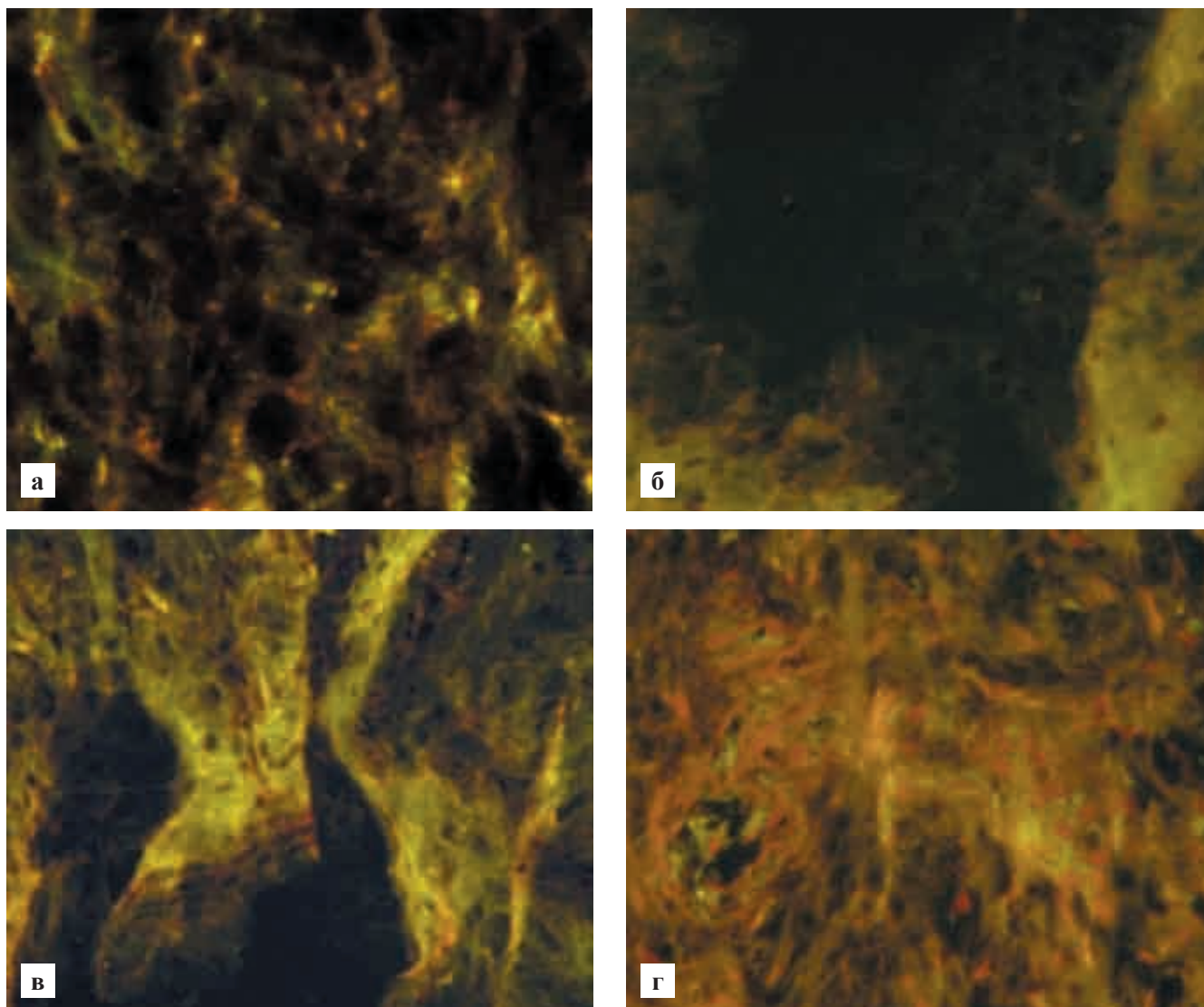


Рис. 5. Препараты ЛТ на 28-е сутки нормотермической консервации. ИГХ-реакция на маркеры ММСК (CD90, CD105, виментин) и HLA-G-рецепторы Люминесцентная микроскопия; $\times 200$. Отмечается яркое зеленое свечение маркеров ММСК и HLA-G-рецепторов: а – препарат ЛТ, окрашенный АТ к CD105; б – препарат ЛТ, окрашенный АТ к виментину; в – препарат ЛТ, окрашенный АТ к CD90; г – препарат ЛТ, окрашенный АТ к HLA-G

Функциональную сохранность ЛТ, ранее криоконсервированных в I группе исследований, оценивали по динамике изменения содержания про- и противовоспалительных цитокинов в инкубационной среде и по экспрессии маркеров ММСК и HLA-G-рецепторов в этих ЛТ. Наше исследование показало (рис. 7), что в процессе нормотермической реконсервации в течение 21 суток идет постепенное и более выраженное увеличение содержания противовоспалительных цитокинов на фоне слабо выраженного повышения уровня провоспалительных цитокинов. Эти данные свидетельствуют о неглубоком повреждении клеток ЛТ и способности их к восстановлению после криоконсервации, что подтверждается нашими данными о сохраняющейся экспрессии CD90, CD105, виментина и HLA-G в клетках ЛТ из I группы опытов.

Полученные результаты позволяют нам также заключить, что используемая технология криоконсервации ЛТ может быть применена для создания криобанка ЛТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное исследование показало, что клетки ЛТ, полученных от доноров-трупов, подвергшихся нормотермической консервации в течение 28 суток с использованием среды Борзенка–Мороз или стандартной культуральной среды, сохраняют свою жизнеспособность, пролиферативную активность, способность поддерживать цитокиновый баланс, а также активизировать экспрессию ММСК-подобных лимбальных клеток и их толерогенные свойства (экспрессия рецепторов HLA-G),

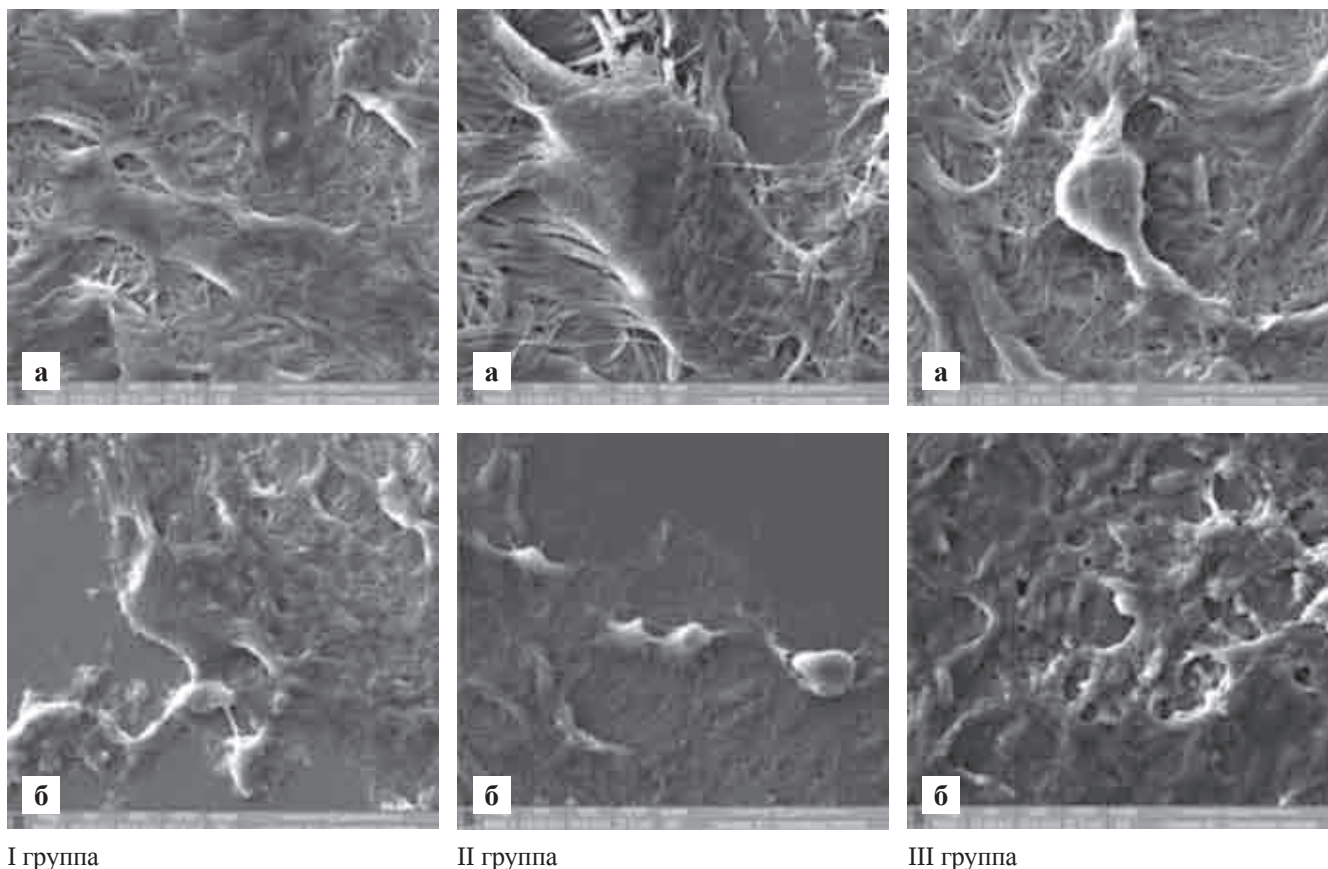


Рис. 6. Сканирующая электронная микроскопия разных полей препаратов ЛТ, консервированных в различных температурных режимах и средах; $\times 8000$. I группа – препарат ЛТ на 1-е сутки после криоконсервации ($t = -80^\circ\text{C}$) в среде Борзенка–Мороз с добавлением ДМСО в течение 1 месяца; II группа – препарат ЛТ на 1-е сутки после криоконсервации ($t = -80^\circ\text{C}$) в среде Борзенка–Мороз без добавления ДМСО в течение 1 месяца; III группа – нормотермический контроль, 28-е сутки

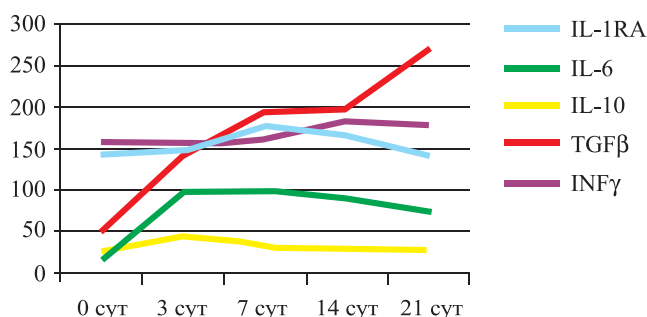


Рис. 7. Динамика содержания про- и противовоспалительных цитокинов в инкубационной среде в процессе повторной нормотермической консервации ЛТ, прошедших стадию заморозки в среде с криопротектором (I группа)

которые особенно необходимы при сочетанных трансплантациях в группах высокого риска.

Криоконсервация ЛТ в среде Борзенка–Мороз с добавлением ДМСО при -80°C в течение 1 месяца позволяет сохранять ультраструктуру ткани ЛТ, а также способность клеток ЛТ обратимо поддерживать цитокиновый баланс, фенотип ММСК и толерогенные свойства, что может служить основанием для создания криобанка ЛТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Балаян Т.Г.* Дифференцированная тактика иммуносупрессивного лечения при кератопластике высокого риска: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2008. С. 23–24.
2. *Борзенко С.А.* Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: Дис. ... докт. мед. наук. М. 2008. С. 240–259.
3. *Готье С.В.* Иммуносупрессия при трансплантации солидных органов. Тверь: Триада, 2011. С. 472.
4. *Кротова Е.В.* Клинико-иммунологические аспекты рекератопластики различными видами донорского материала: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 1994. С. 24.
5. *Онищенко Н.А., Артамонов С.Д., Крашенинников М.Е. и др.* Клетки костного мозга донора как регуляторы иммунной толерантности в организме реципиента при аллогенной пересадке органов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2009. № 4. С. 97–102.
6. *Шумаков В.И., Онищенко Н.А.* Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. М.: Лавр, 2009. С. 49–100.
7. *Aggarwal S., Pittenger M.F.* Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // Blood. 2005. Vol. 105. P. 1815–1822.

8. *Ardjomand N., Berghold A., Reich M.E.* Loss of corneal Langerhans cells during storage in organ culture medium, Optisol and McCarey-Kaufman medium // *Eye*. 1998. Vol. 12. P. 134–138.
9. *Du Y., Funderburgh M.L., Mann M.M. et al.* Multipotent stem cells in human corneal stroma // *Stem Cells*. 2005. Vol. 23. P. 1266–1275.
10. *Dua H.S., Azuara-Blanco A.A.* Allolimbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency // *Br. J. Ophthalmol.* 1999. Vol. 83. P. 414–419.
11. *Grueterich M., Scheffer C., Tseng G.* Human Limbal Progenitor Cells Expanded on Intact Amniotic Membrane *ex vivo* // *Arch. Ophthalmol.* 2002. Vol. 120. P. 783–790.
12. *Holland E.J., DeRuyter D.N., Doughman D.J.* Langerhans cells in organ-cultured corneas // *Arch. Ophthalmol.* 1987. Vol. 105. P. 542–545.
13. *Kenyon K.R., Tseng S.C.G.* Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders // *Ophthalmology*. 1989. Vol. 96. P. 709–723.
14. *Koizumi N., Cooper L.J., Fullwood N.J. et al.* An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002. Vol. 43, № 7. P. 2114–2121.
15. *Majumdar M.K., Keane-Moore M., Buyaner D. et al.* Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells // *J. Biomed. Sci.* 2003. Vol. 10. P. 228–241.
16. *Pleyer U., Bertelmann E.* Differential diagnosis and therapy of graft rejection after keratoplasty // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 2005. Vol. 222. № 11. P. 863–869.
17. *Polisetty N., Fatima A., Madhira S.L. et al.* Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye // *Mol. Vis.* 2008. Vol. 14. P. 431–442.
18. *Pricola K.L., Haleem-Smith H., Song Y.* Interleukin-6 supports the bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness of ERK1/2-dependent mechanism // *J. of Cellular Biochemistry*. 2009. Vol. 108. P. 577–588.
19. *Starzl T.E.* Chimerism and tolerance in transplantation // *PNAS*. 2004. Vol. 101, № 2. P. 14607–14614.
20. *Zito-Abbad E., Borderie V.M., Baudrimont M. et al.* Corneal epithelial cultures generated from organ-cultured limbal tissue: factors influencing epithelial cell growth // *Curr. Eye Res.* 2006. May. Vol. 31, № 5. P. 391–399.