

ЛИМБАЛЬНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КАК СПОСОБ ИНДУКЦИИ ЛОКАЛЬНОЙ ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПРИ КЕРАТОПЛАСТИКЕ ВЫСОКОГО РИСКА

Тонаева Х.Д.¹, Онищенко Н.А.², Борзенко С.А.¹

¹ ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н.Федорова» Росмедтехнологий, Москва

² ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва

Активация деструктивного для трансплантата роговицы адаптивного и врожденного иммунитета является основной причиной помутнения его при кератопластике высокого риска. Около 46% реципиентов из этой группы являются абсолютно резистентными к применению иммуносупрессивной терапии глюкокортикоидами и циклоспорином А и нуждаются в применении толерирующих воздействий. Обнаружение в лимбальной зоне мезенхимальных прогениторных клеток, с фенотипом прогениторных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, открывает перспективу их использования для индукции локальной иммунной толерантности при кератопластике высокого риска, что позволит повысить качество приживления трансплантата роговицы и сократить сроки медикаментозной иммуносупрессии.

Ключевые слова: кератопластика, иммунная толерантность, мезенхимальные прогениторные клетки лимба.

LIMBAL TRANSPLANTATION AS A METHOD OF LOCAL IMMUNE TOLERANCE INDUCTION IN HIGH RISK KERATOPLASTY

Tonaeva Kh.D.¹, Onishchenko N.A.², Borzenok S.A.¹

¹ The Fedorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow

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

Activation of destructive adaptive and inherited immunity is the main reason of graft opacification by high-risk keratoplasty. Approximately 46% of recipients from this group are absolute resistant to immunosuppressive therapy with glucocorticoids and cyclosporine A and need tolerization. Discovery of limbal mesenchymal stem cells that resemble phenotype of mesenchymal stem cells of bone marrow reveal the prospects of their use like inductors of local immune tolerance in high-risk keratoplasty. It will help to increase percentage of successful engraftment and shorten the period of medical immunosuppression.

Key words: keratoplasty, immune tolerance, limbal mesenchymal stem cells.

Заболевания и травмы роговицы, приводящие к ее помутнению (бельму), занимают одно из ведущих мест среди причин слепоты и слабовидения. Трансплантация донорской роговицы – сквозная и другие виды кератопластики – является единственным эффективным методом выбора, способным максимально реабилитировать и повысить качество жизни пациентов с хирургическими заболеваниями роговицы. Между тем, несмотря на совершенствование

микрохирургической техники, принципов отбора и консервации донорского материала, а также обеспечения качественной пред- и послеоперационной терапии реципиентов, процент прозрачного приживления трансплантатов роговицы составляет 35–95% и зависит от этиологии помутнения роговицы и сроков посттрансплантационного наблюдения [3, 12].

Так, в течение первого года после кератопластики, проведенной при кератоконусе, прозрачное при-

Статья поступила в редакцию 7.02.11 г.

Контакты: Тонаева Хадиджат Джанхуватовна, аспирант, врач-офтальмолог лаборатории трансплантологии с глазным тканевым банком ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий.

Тел. 8-905-515-66-11, e-mail: tonxd15@gmail.com

живление (удачный исход) роговичного трансплантата достигает 95%, рубцах роговицы – 82%, буллезной кератопатии – 75%, кератитах – 72%, ожоговых бельмах – 38%. Однако с увеличением сроков посттрансплантационного периода доля прозрачного приживления трансплантатов роговиц уменьшается, а количество повторных кератопластик в общей структуре пересадок роговиц значительно возрастает, причем половина из них заканчивается очередным помутнением роговичного трансплантата.

Основными причинами помутнения трансплантата (неудачный исход) роговицы могут быть: его первичная несостоятельность, обусловленная низкой плотностью клеток заднего эпителия, ответственных за насосную функцию и прозрачность стромы роговицы; реакция отторжения трансплантата в результате активации системы специфического (адаптивного) иммунитета реципиента на донорские антигены; развитие вторичной глаукомы, а также рецидив первичного основного заболевания роговицы [34].

В настоящее время, благодаря достижениям микрохирургической техники, использованию протекторов эндотелия (внутреннего эпителия) роговицы, оптимизации протоколов отбора и консервации трупных донорских роговиц, частота помутнения трансплантата роговицы вследствие его первичной несостоятельности, связанной с неиммунными факторами, сократилась до 1% [3].

Послеоперационная глаукома, которая в недалеком прошлом занимала второе место среди причин помутнения роговичного трансплантата, с помощью современных методов офтальмохирургии практически полностью устранена [10]. Достаточно частой причиной помутнения роговичного трансплантата остается рецидив первичного заболевания роговицы, в частности рецидив кератитов герпетической этиологии. В 47% наблюдений после кератопластики возникает манифестация латентных инфекций, которая в 60% у этой категории реципиентов приводит к развитию реакции отторжения трансплантатов роговицы путем первичной активации системы врожденного иммунитета [30].

У пациентов с наследственными формами дистрофий роговицы симптомы болезни трансплантата, связанные с развитием иммунобиологических реакций после кератопластики, встречаются реже, чем при кератитах, хорошо поддаются медикаментозной иммуносупрессии и проявляются лишь в 15% наблюдений в отдаленные сроки [45].

По данным Turpin и соавторов [45], к наиболее значимым факторам высокого риска помутнения роговичных трансплантатов следует относить вялотекущие посттрансплантационные воспалительные реакции переднего сегмента глаза, возникно-

вление васкуляризации трансплантата, повторные и двусторонние кератопластики, молодой возраст реципиента.

По мнению ряда авторов [23], реакции острого и хронического отторжения роговичных трансплантатов, развивающиеся в результате активации адаптивного (специфического) иммунитета и врожденного (неспецифического) иммунитета, являются основными причинами неблагоприятного исхода кератопластик и возникают в 25–70% от всех наблюдений в зависимости от этиологии помутнения роговицы.

Развитие деструктивного иммунного ответа на трансплантат роговицы

В 1948 г. Roufique и соавт. [34] впервые ввели в офтальмологическую литературу термин «болезнь трансплантата роговицы», а в 1972 г. на Международном офтальмологическом симпозиуме, посвященном этой проблеме, было принято научное определение термина «реакция отторжения трансплантата роговицы», согласно которому, соответствующий диагноз «может быть поставлен, если первично прозрачный трансплантат роговицы на спокойном глазу становится отечным с признаками воспаления переднего сегмента глаза, включая эндотелиальную линию отторжения, не ранее чем через 10 дней после кератопластики». Возникновение реакции отторжения трансплантата роговицы является следствием выраженной активации системы адаптивного иммунитета реципиента, при которой тканевые компоненты донорской роговицы, выступающие в роли антигена, и антигенпрезентирующие клетки (клетки Лангерганса или дендритные клетки), пассивно перенесенные с трансплантатом (лейкоциты-пассажиры) [31], являются главными индукторами эффекторных иммунных реакций в ткани трансплантата, вызывающих его повреждение или гибель [19]. Интенсивность, продолжительность и исход иммунной реакции на трансплантат определяются степенью антигенных различий между донором и реципиентом, особенностями трансплантата и ложа, в которое осуществляют пересадку (наличие сосудистой сети и лимфоидной ткани), наличием предшествующей перекрестной аллоантигенной сенсibilизации реципиента, а также выбранной схемой иммуносупрессии [16].

Развитие деструктивного иммунного ответа в организме реципиента на трансплантат включает три фазы: фазу распознавания аллоантигена, фазу иммунной перестройки и эффекторную фазу. После пересадки лейкоциты-пассажиры из трансплантата, представляющие собой незрелые дендритные клетки донора, мигрируют в лимфоидные органы реципиента и там быстро дифференцируются, приобре-

тая функции донорспецифичных антигенпрезентирующих клеток (АПК). При реализации II фазы иммунного ответа в организме реципиента активируются два пути презентации аллоантигенов интактным (наивным) Т-лимфоцитам реципиента, которые обозначаются как прямой и непрямой (косвенный) пути [1]. АПК, представляющие донорский антиген, начинают напрямую стимулировать большую субпопуляцию наивных Т-клеток реципиента с образованием CD4 (хелперов) первого и второго типов (Th1, Th2), осуществляющих эффекторный ответ, а также реакцию CD8 (киллеров) и В-лимфоцитов (индукторов антителогенеза), ответственных за клеточную и гуморальную составляющие процесса отторжения органа или ткани. Этот путь представления аллоантигена донорскими АПК наивным Т-клеткам (T₀) реципиента назван прямым. Прямой путь активируется при остром отторжении в раннем посттрансплантационном периоде (в течение 1–2 мес.), когда пересаженный орган еще содержит большое количество донорских дендритных АПК. Ослабить этот путь возможно при подборе донора и реципиента по системе HLA. Однако в связи с гистогематической привилегированностью и отсутствием сосудов в тканях роговичного трансплантата подбор донора по HLA-системе улучшает результаты сквозной кератопластики только на 12–15% и в настоящее время применяется крайне редко [14].

Второй – непрямой, или классический, путь представления донорского антигена активируется и играет ведущую роль в развитии хронического отторжения. При реализации этого пути в АПК реципиента происходит сначала процессинг (распознавание) донорских белков, синтезированных на HLA- и на минорных генах гистосовместимости, по которым донорский орган или ткань отличается от органа или ткани реципиента, а затем эти клетки презентуют процессированный антиген аутологичным наивным Т-клеткам [1].

Дифференцировка Т-клеток, возникающая после антигенной стимуляции по прямому и косвенному пути, создает в лимфоидных органах пул зрелых функционально активных эффекторных клеток, а также субпопуляцию Т-регуляторных клеток (Treg) [8].

Известно, что дифференцированные CD8 Т-клетки поступают из органов иммунной системы в трансплантат и вступают в специфическую реакцию разрушения его за счет активации собственных антигенраспознающих рецепторов [38, 40]. Эту реакцию усиливают Th₁-клетки воспаления, которые, секретируя IL-2 и IFN-γ, привлекают в зону отторжения макрофаги, активизируют их, вызывая тем самым неспецифический лизис трансплантата. Показано, что донорспецифичные Т-лимфоциты, сен-

сибилизированные через путь непрямого распознавания антигена, более эффективно кооперируются с В-лимфоцитами, в результате чего возрастает продукция антител к антигенам донора. Следствием таких событий становится отторжение трансплантата по гуморальному механизму, при котором имеет место постепенно нарастающее повреждение сосудистого русла, а также фиксация в эндотелии сосудов и ткани трансплантата иммуноглобулинов G, M, A и компонентов комплемента [1]. Th₂-хелперы и Treg вместе образуют такой пул CD4 Т-клеток, который осуществляет надзор и регуляцию специфичности, а также силу эффекторного ответа Т- и В-лимфоцитов: Th₂ разрешают и стимулируют эффекторные реакции CD8 Т- и В-лимфоцитов; Treg запрещают и прекращают эффекторный ответ, причем обе субпопуляции CD4-клеток способны также образовывать соответствующие клоны клеток памяти, которые сохраняются в течение всей жизни. При этом выработка эффекторного ответа (реактивность или толерантность) по презентуемому антигену определяется характером взаимодействия Th₂-хелперов и Treg в конкретных условиях. Следует подчеркнуть, что значение CD8 и CD4 популяций Т-клеток и их субклонов не ограничивается участием этих клеток в процессах иммуногенеза – они являются индукторами физиологической и репаративной регенерации клеток и тканей в организме за счет продукции ими большого спектра регуляторных пептидов, соотношение которых определяет состояние процессов морфогенеза: гибели, сохранения или активной регенерации клеток поврежденного органа [7].

В связи с особенностями строения роговицы, отсутствием в ней кровеносных и лимфатических сосудов и ее изоляцией от других тканей гематофтальмическим барьером, еще со времен академика В.П. Филатова у офтальмологов возникали сомнения в наличии антигенных свойств у самой роговичной ткани. Однако в опытах на животных с трансплантацией роговицы была подтверждена подчиненность ее общим принципам развития деструктивного иммунного ответа [32]. Было установлено, что белкам роговицы присущи антигенные свойства, что из экстрактов роговицы различными способами может быть выделено более десяти антигенов, представляющих наружный и внутренний эпителий, а также строму, и что некоторые антигены роговицы способны вызывать аутосенсibilизацию и стимулировать синтез антител [6].

По данным литературы [19, 31], характер приживления роговичных трансплантатов в 70–80% наблюдений находится в прямой зависимости от предоперационной активации иммунитета и послеоперационной динамики его показателей: от соотношения пулов отдельных популяций иммуноком-

петентных клеток, количества циркулирующих иммунных комплексов, уровней антител и цитокинов, в первую очередь IL-1 β и TNF- α в сыворотке крови и в слезе, а также от наличия сенсibilизации иммунокомпетентных клеток к антигенам роговицы.

Иммуносупрессивная терапия при трансплантации роговицы

Традиционно для защиты трансплантата роговицы в офтальмологии применяют глюкокортикоиды, иммуносупрессивный эффект которых связывают с торможением синтеза ряда белков и пептидов, прежде всего цитокинов IL-1 β и IL-2, которые препятствуют активации Т-лимфоцитов и макрофагов, а также развитию клеточных иммунных реакций [2]. Под действием глюкокортикоидов снижается синтез и активность интерферонов, простагландинов, лейкотриенов, брадикинина, фактора активации тромбоцитов, гистамина и нейтральных протеаз, которые, как известно, участвуют в развитии воспалительных реакций. Однако при использовании глюкокортикоидов в средних дозах синтез антител не нарушается [24]. У пациентов, не входящих в группу высокого риска отторжения кератотрансплантата, при отсутствии признаков системного иммунологического дисбаланса часто ограничиваются местным применением глюкокортикоидов. Между тем локальная стероидная терапия оказывается явно недостаточной при выявлении системного иммунологического дисбаланса, характерного для больных с высоким риском отторжения трансплантата при кератопластике (например, при ожогах роговицы). В таких случаях используются схемы внутривенного и перорального введения глюкокортикоидов, но часто эти препараты даже в высоких дозах не могут обеспечить прозрачного приживления кератотрансплантата [42].

Цитостатики (циклофосфамид, 6-меркаптопурин, а также азатиоприн), из-за серьезных побочных эффектов, вызываемых ими (нарушение гемопоэза и регенерации тканей, угнетение всех форм иммунного ответа, в том числе защиты от инфекций), в настоящее время для предотвращения развития болезни трансплантата используются очень редко.

Препаратом выбора в офтальмологии стал селективный иммуносупрессивный препарат – циклоспорин А (сандиммун, имуспорин, консупрен), механизм действия которого обусловлен торможением экспрессии генов цитокинов, активаторов отторжения, в том числе IL-2 и IFN- γ . В отличие от стероидов циклоспорин А не только уменьшает высвобождение IL-2, но и блокирует связывание его с рецепторами на клеточной мембране [22], в результате чего блокируется активация Т- (преимущественно

цитотоксических и хелперов) и В-лимфоцитов и, таким образом, подавляются клеточные иммунные реакции. В отличие от цитостатиков циклоспорин А не угнетает гемопоэз и не влияет на функции фагоцитов, т. е. не нарушает противоинфекционный иммунитет [47].

По данным М.О. Price и F.W. Price [35], представляется целесообразным местное сочетанное применение циклоспорино А и глюкокортикоидов, которое более чем в 2 раза увеличивает вероятность прозрачного приживления роговичного трансплантата при повторной пересадке роговицы по сравнению с местным применением только глюкокортикоидов; использование глазных капель циклоспорино А в комбинации с пероральным приемом стероидов также позволяет значительно снизить частоту реакций отторжения и ускорить отмену стероидов.

Наряду с положительными отзывами о комбинированном местном применении циклоспорино А и глюкокортикоидов все исследователи указывают и на их отрицательные свойства, такие как развитие вторичной глаукомы, катаракты, эпителиопатии роговицы, манифестации латентных вирусных инфекций, грибковых поражений и присоединение вторичной бактериальной инфекции [23]. В случаях системного применения этих препаратов отмечается развитие гепато- и нефропатий. Исследованиями Т.Г. Балаян [2] было показано, что около 46% лиц в группе кератопластики высокого риска являются абсолютно резистентными к применению как локальной, так и системной иммуносупрессивной терапии глюкокортикоидами и циклоспорином А.

В целом мировой опыт применения иммуносупрессивной терапии при трансплантациях показывает, что непрерывное применение малых доз и только одного иммуносупрессора в большинстве случаев позволяет достигнуть многолетней квазитолерантности, то есть долгосрочного функционирования органа (ткани) на фоне иммуносупрессии. Однако даже такой щадящий способ медикаментозной иммуносупрессии многими зарубежными авторами признается неадекватным и неоптимальным как в плане продолжительности жизни больного, так и в плане ее качества. Такая оценка современной медикаментозной иммуносупрессии привела в последние годы к интенсивному поиску новых методов подавления иммунных реакций, способных с помощью филогенетически обусловленных в организме реципиента механизмов создать в посттрансплантационном периоде надежную и стабильную антигенспецифическую толерантность, обеспечивающую многолетнее выживание как трансплантата, так и пациента, при качестве жизни, практически не отличающемся от здорового человека [40].

Перспективы сотрансплантации лимбальных стволовых/прогениторных клеток при кератопластике высокого риска в качестве метода индукции локальной иммунной толерантности

Известно, что все реакции распознавания аллоантигена происходят главным образом в периферических лимфоидных органах: селезенке, лимфоузлах и лимфоидных образованиях типа пейеровых бляшек в кишечнике при непосредственном участии наивных лимфоцитов (T_0) и антигенпрезентирующих клеток (АПК). Там же протекают процессы пролиферации и дифференцировки этих клеток. Образовавшиеся в результате реакции распознавания эффекторные формы В-лимфоцитов, CD4- (Th1-, Th2-, Treg-клетки) и CD8-Т-лимфоциты, а также клетки памяти в дальнейшем принимают участие в реализации эффекторных реакций в тканях трансплантата. Только в периферических иммунокомпетентных органах создаются условия для окончательного созревания наивного Т-лимфоцита, но и там этот процесс регулируется множеством условий, при отсутствии которых происходит либо гибель лимфоцита апоптозом, либо развивается его анархия (ареактивность).

В последние годы многочисленными исследованиями установлено, что важными участниками регуляции развития эффекторных реакций в тканях трансплантата, формирования иммунной толерантности, а также восстановительной регенерации поврежденных тканей являются костный мозг и тимус – центральные органы иммуногенеза в организме [5, 7]. Оказалось, что введение стволовых/прогениторных клеток костного мозга (гемопоетической или мезенхимальной стромальной фракции) при развитии иммунопатологического процесса в организме (аутоиммунная язва желудка, аутоиммунный сахарный диабет и др.) не только стимулирует ускоренную регенерацию поврежденного органа, но также активирует восстановление структуры и перепрограммирование функции лимфоидных органов (тимуса и селезенки). Это проявляется пролонгированной коррекцией цитокинового баланса в организме и накоплением в нем Treg-клеток – CD4+CD25+Treg с супрессорными свойствами [5, 33]. Причем такие клетки обнаруживаются не только в органах иммуногенеза и периферической крови, но и в поврежденных тканях, вызывая супрессию эффекторных (цитотоксических) Т-клеток.

Исследованиями Joffre и соавт. [27] было также установлено, что при развитии острого и хронического отторжения трансплантата именно Т-клеточно-опосредованная иммунорегуляция является одним из главных механизмов поддержания антигенспецифической толерантности в организме.

При этом формирование антигенспецифической толерантности достигается путем «специфического перевоспитания» (кондиционирования) донорским антигеном наивных T_0 -лимфоцитов реципиента при контакте их с незрелыми АПК донора (дендритные клетки с плазмодным фенотипом, выделенные из малодифференцированных клеток костного мозга донора), в процессе которого происходит регуляторное накопление в организме активных супрессоров – Treg-клеток с фенотипом CD4+CD25+Foxp3+.

В других исследованиях [48] было подтверждено, что эти клетки пролиферируют и сохраняют свою антигензависимую супрессивную функцию в дозозависимых исследованиях, если в качестве АПК были использованы активированные антигеном дендритные клетки донора. Дальнейший анализ регуляторной функции CD4+CD25+Foxp3+ клеток в модельных системах показал, что такие лимфоциты, однажды активированные дендритными клетками донора, уже не нуждаются в антигене и подавляют эффекторные реакции *in vitro* и *in vivo*, т. е. являются «профессиональными супрессорами» [39]. Активация гена Foxp3 является существенным фактором для функции Treg-клеток, так как приводит к блоку синтеза провоспалительных цитокинов, в частности IFN- γ . Многочисленными исследованиями показана способность Treg к продлению выживания аллотрансплантата, которая была обусловлена предотвращением пролиферации эффекторных клеток как путем прямого взаимодействия и элиминации антигенспецифических клонов, так и путем создания условий для активации синтеза такого профиля цитокинов, при котором супрессируются и антигеннеспецифические клоны (так называемая «инфекционная толерантность») [41, 27]. Когда Treg-клетки активированы антигеном, они продуцируют цитокины TGF- β и IL-10 с супрессивными свойствами, и очевидно, этим можно объяснить тот факт, что Treg-клетки угнетают пролиферацию и продукцию провоспалительных цитокинов наивными CD4+ (CD4+CD25–), CD8+, а также Th1- и Th2-клетками [44]. Большинство Treg-клеток запрограммированы в тимусе и составляют пул естественных или натуральных Treg (нTreg). Однако оказалось, что общий пул Treg может быть увеличен за счет индуцированного, или адаптивного, пула Treg (иTreg), который образуется *de novo* из пула наивных CD4+ предшественников в периферической лимфоидной ткани при взаимодействии Т-клеточного рецептора T_0 -клеток с донорским антигеном в присутствии TGF- β и IL-2 [20], превращающих фенотип наивных Т-клеток (CD4+CD25–) в фенотип натуральных супрессоров – Treg (CD4+CD25+) за счет экспрессии в них транскрипционного фактора гена Foxp3 [17]. В ряде работ [33, 46, 49] уточняются механизмы супрессорного действия Treg-клеток и

развитие иммунной толерантности, среди которых важную роль отводят:

- 1) клеточной контактно-зависимой супрессии, опосредуемой через CTLA-4-CD80 или CD86 или через прямые цитолитические механизмы;
- 2) поглощению Treg-клетками ростового фактора – IL-2, в результате чего ингибируется дифференцировка и пролиферация Т-эффекторных CD8+ клеток, а также индуцируется их апоптоз;
- 3) продукции Treg-клетками противовоспалительных цитокинов – IL-10, TGF- β с супрессивными свойствами и активации костимулирующих молекул, которые, в свою очередь, способствуют дифференцировке и генерации новых Treg-клеток.

Полагают, что пул Treg-клеток и надежность выработки иммунной толерантности в организме могут быть повышены за счет активации (независимой экспрессии) гена Foxp3 не только наивных, но и антигенспецифических CD4+ Т-клеток памяти и что использование стратегии избирательной (антигенспецифической) Treg иммунной модуляции позволит избавиться от проблем, сопутствующих медикаментозной иммуносупрессивной терапии, пожизненно используемой для создания иммунной толерантности в организме при трансплантации органов и тканей [11, 39].

В настоящее время полагают, что стратегия антигенспецифической иммуномодуляции может быть с большим успехом достигнута при использовании мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, которые обладают иммунорегуляторными свойствами, способствующими ограничению и подавлению иммунных реакций на донорский антиген. Известно, что МСК человека слабо экспрессируют HLA молекулы класса I и не экспрессируют HLA молекулы класса II, а также CD80, CD86, CD40 или CD40L костимулирующие молекулы [21, 29], и поэтому МСК не в состоянии запустить Т-клеточную активацию [15]. Более того, МСК способны ингибировать аллостимулированную Т-клеточную пролиферацию и активировать размножение CD4+CD25+ Т-клеток [9], что связывают с активацией ими секреции таких медиаторов, как простагландин E2 (PGE2), TGF β 1, IL-10 и HGF [15, 21]. В свою очередь, МСК ингибируют дифференцировку моноцитов в дендритные клетки [26], модулируют функции В-клеток [18] и ингибируют цитотоксичность клеток-киллеров (NK) [43]. Указанные свойства МСК открывают новые перспективы использования их для торможения развития реакции отторжения трансплантата.

Считается, что стволовые/прогениторные клетки (СПК) костного мозга являются наиболее доступным источником получения регионарных СПК, однако список тканей, содержащих СПК, которые

могли бы быть использованы для индукции иммунной толерантности, достаточно велик и включает практически все регенерирующие ткани, очевидно, и ткани глаза: роговицу и сетчатку.

Из литературы известно [4], что еще в 1971 г. Davanger и Evensen, наблюдая миграцию эпителия от лимба к центру роговицы в процессе ее эпителизации, впервые предположили, что обновление роговичного эпителия происходит за счет клеток, расположенных в зоне лимба. Лимб анатомически окружен сосудами (палисадами Фогта), обеспечивающими снабжение клеток этой зоны питательными веществами и регуляторными пептидами и представляет собой нишу для регионарных СПК. Дальнейшие исследования подтвердили локализацию СПК в лимбальной зоне и позволили охарактеризовать их как клетки с высокой пролиферативной способностью и большей продолжительностью существования по сравнению с центральными клетками роговицы. Было показано, что клетки лимбальной зоны не экспрессируют цитокератин 3 – маркер дифференцировки роговичных кератиноцитов, что хирургическое удаление лимбальной зоны приводит к замедлению регенерации роговицы и образованию эпителия «нероговичной природы», а ауто- или аллогенная лимбальная трансплантация – к восстановлению роговичного эпителия [25]. В ряде работ также показано, что клетки лимбальной зоны являются СПК именно для роговицы, но не для конъюнктивальных кератиноцитов, так как у лимбальных СПК имеется комплекс маркеров, таких как p63, экспрессирующихся в ядре, ABCG2, экспрессирующихся в цитоплазме и alpha9-интегрин – на мембране клетки, которые позволяют легко отличить эти клетки от других эпителиальных клеток в роговице [13, 28, 37]. Обнаруженные в лимбальной зоне мезенхимальные СПК, обладающие фенотипом, сходным с мезенхимальными СПК костного мозга [36], благодаря своим паракринным свойствам и межклеточным взаимодействиям обеспечивают процессы самоподдержания пула эпителиальных СПК и пожизненную восстановительную регенерацию роговицы.

Таким образом, существование в лимбальной зоне роговицы клеток со стволовыми/прогениторными свойствами позволяет предполагать целесообразность их использования для выработки местной иммунной толерантности при сочетанной трансплантации с донорской роговицей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявление в лимбальной зоне роговицы прогениторных клеток со свойствами прогениторных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга открывает перспективу их использования для ин-

дукции локальной иммунной толерантности при трансплантации роговицы. Сочетанная трансплантация клеток лимбальной зоны при кератопластике должна повысить качество приживления трансплантата роговицы, способствовать сокращению сроков применения медикаментозной иммуносупрессии, а также улучшить качество жизни пациентов, резистентных к медикаментозной иммуносупрессии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артамонов С.Д., Онищенко Н.А., Башкина Л.В. и др. I. Роль систем врожденного и адаптивного иммунитета в развитии деструктивного иммунного ответа организма на аллотрансплантат. II. Система ауто толерантности и ее функционирование при трансплантации аллогенных органов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. № 3. С. 112–128.
2. Балаян Т.Г. Дифференцированная тактика иммуносупрессивного лечения при кератопластике высокого риска: Дисс. ... канд. мед. наук. М., 2008. С. 123–124.
3. Борзенко С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: Дисс. ... докт. мед. наук. М., 2008. С. 23–26.
4. Николаева Л.Р., Ченцова Е.В. Лимбальная клеточная недостаточность // Вестник офтальмологии. 2006. № 3. С. 43–47.
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. Слепова О.С. Органоспецифический аутоиммунитет при воспалительной патологии сетчатки и увеального тракта. Патогенез, диагностика, обоснование терапии: Дисс. ... докт. биол. наук. М., 1991. С. 221–227.
7. Шумаков В.И., Онищенко Н.А. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. М.: Лавр, 2009.
8. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор Foxp3 // Иммунология. 2006. № 3. С. 176–188.
9. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // Blood. 2005. Vol. 105. P. 1815–1822.
10. Aldave A.J., Rudd J.C., Cohen E.J. et al. The role of glaucoma therapy in the need for repeat penetrating keratoplasty // Cornea. 2000. Vol. 19. P. 6772–6776.
11. Allan S.E., Alstad A.N., Merindol N. et al. Generation of potent and stable human CD4⁺ T regulatory cells by activation – independent expression of Foxp3 // Mol. Ther. 2008. Vol. 16. P. 194–202.
12. Ardis S., Di Quirico G., Barahmandpour S. et al. Quality control of 2721 cornea transplantations of issued by Center of Corneal Analysis and conservation by the Bank of Tissue and Cells of Tuscany // Transplant Proc. 2003. Vol. 35. № 5. P. 2029–2030.
13. Arpitha P., Prajna N.V., Srinivasan M., Muthukkaruppan V. A method to isolate human limbal basal cells enriched for a subset of epithelial cells with a large nucleus/cytoplasm ratio expressing high levels of p63 // Microsc. Res. Tech. 2008. (6). P. 469–476.
14. Bartels M.C., Doxiadis I.I., Colen T.P. et al. Long-term outcome in high-risk corneal transplantation and the influence of HLA-A and HLA-B matching // Cornea. 2003. Vol. 22. № 6. P. 552–556.
15. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo // Exp. Hematol. 2002. Vol. 30. P. 42–48.
16. Bohringer D., Spierings E., Enczmann J. et al. Matching of the minor histocompatibility antigen HLA-A1/H-Y may improve prognosis in corneal transplantation // Transplantation. 2006. Vol. 27. № 8. P. 1037–1041.
17. Chatila T.A. Molecular mechanisms of regulatory T-cell development // Chem. Immunol. Allergy (Basel, Karger). 2008. Vol. 94. P. 16–28.
18. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions // Blood. 2006. Vol. 107. P. 367–372.
19. Coster D.J., Williams K.A. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation // Am. J. Ophthalmol. 2005. Vol. 140. № 6. P. 1112–1122.
20. Davidson T.S., Di Paolo R.J., Andersson J. et al. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF- β -mediated induction of Foxp3 T-regulatory cells // J. Immunol. 2007. Vol. 178. P. 4022–4026.
21. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli // Blood. 2002. Vol. 99. P. 3838–3843.
22. Foulks G.N. Topical cyclosporine for treatment of ocular surface disease // Int. Ophthalmol. Clin. 2006. Vol. 46. № 4. P. 105–122.
23. Hamrah P., Djalilian A.R., Stulting R.D. Immunologically High-Risk Penetrating Keratoplasty. In: Kratchmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. // Cornea. 2nd Edition, Chapter 133. St. Louis: Mosby. 2005. P. 1619–1635.
24. Hirose R., Vincenti F. Immunosuppression: today, tomorrow, and withdrawal // Semin. Liver. Dis. 2006. Vol. 26. № 3. P. 201–210.
25. James E.S., Rowe A., Ilari L. et al. The potential for Eye bank limbal rings to generate cultured corneal epithelial allografts // Cornea. 2001. Vol. 20. № 5. C. 488–494.
26. Jiang X.X., Zhang Y., Liu B. et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells // Blood. 2005. Vol. 105. P. 4120–4126.
27. Joffre O., Santolaria T., Calise D. et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3 regulatory T-lymphocytes // Nat. Med. 2008. Vol. 14. P. 888–892.
28. Krulova M., Pokorna K., Lencova A. et al. A rapid separation of two distinct populations of mouse corneal

- epithelial cells with limbal stem cell characteristics by centrifugation on percoll gradient // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008. Vol. 49 (9). P. 3903–3908.
29. *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.
30. *Mayer K., Reinhard T., Reis A. et al.* Synergistic antiherpetic effect of acyclovir and mycophenolate mofetil following keratoplasty in patients with herpetic eye disease: first results of a randomised pilot study // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2003. Vol. 241. № 12. P. 1051–1054.
31. *Niederhorn J.Y.* Immunology and immunomodulation of corneal transplantation // *Int Rev Immunol.* 2002. Vol. 21 (2–3). P. 173–196.
32. *Niederhorn J.Y.* See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege // *Nat. Rev. Immunol.* 2006. Vol. 7. P. 354–359.
33. *Peng Y., Laouar Y., Li M.O. et al.* TGF- β regulates *in vivo* expansion of Foxp3-expressing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells responsible for protection against diabetes // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. Vol. 101. P. 4572–4577.
34. *Pleyer U., Bertelmann E.* Differential diagnosis and therapy of graft rejection after keratoplasty // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 2005. Vol. 222. № 11. P. 863–869.
35. *Price M.O., Price F.W.* Efficacy of topical cyclosporine 0.05% for prevention of cornea transplant rejection episodes // *Ophthalmology*. 2006. Vol. 113. № 10. P. 1785–1790.
36. *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.
37. *Raeder S., Uttheim T.P., Uttheim O.A. et al.* Effect of limbal explant orientation on the histology, phenotype, ultrastructure and barrier function of cultured limbal epithelial cells // *Acta Ophthalmol Scand.* 2007. Vol. 85 (4). P. 377–386.
38. *Reichardt P., Dornbach B., Rong S. et al.* Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse // *Blood*. 2007. Vol. 110 (5). P. 1519–1529.
39. *Roncarolo M.G., Battaglia M.* Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and allogeneic antigens in humans // *Nat. Rev. Immunol.* 2007. Vol. 7. P. 585–598.
40. *Salama A.D., Womer K.L., Sayegh M.H.* Clinical Transplantation Tolerance: Many Rivers to Cross // *J. of Immunology*. 2007. Vol. 178. P. 5419–5423.
41. *Sakaguchi S.* Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6. P. 345–352.
42. *Scheer S., Touzeau O., Borderie V. et al.* Immunosuppression in corneal transplantation // *J. Fr. Ophthalmol.* 2003. Vol. 26. № 6. P. 637–647.
43. *Spaggiari G.M., Capobianco A., Becchetti S. et al.* Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation // *Blood*. 2006. Vol. 107. P. 1484–1490.
44. *Stassen M., Jonuleit H., Muller C. et al.* Differential regulatory capacity of CD25⁺ T regulatory cells and pre-activated CD25⁺ T regulatory cells on development, functional activation and proliferation of Th2 cells // *J. Immunol.* 2004. Vol. 173. P. 267–274.
45. *Tuppin P., Poinard C., Loty B. et al.* Risk factors for corneal regraft in patients on the French waiting list // *Cornea*. 2004. Vol. 23. № 7. P. 704–711.
46. *Van der Vliet H.J., Nieuwenhuis E.E.* IPEx as a result of mutations in FOXP3 // *Clin. Dev. Immunol.* 2007. Vol. 2007. P. 890–917.
47. *Warrington J.S., Shaw L.M.* Pharmacogenetic differences and drug-drug interactions in immunosuppressive therapy // *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2005. Vol. 1. № 3. P. 487–503.
48. *Yamazaki S., Iyoda T., Tarbell K. et al.* Direct expansion of functional CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells // *J. Exp. Med.* 2003. Vol. 198. P. 235–247.
49. *Yamazaki S., Patel M., Harper A. et al.* Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction // *PNAS*. 2006. Vol. 103 (8). P. 2758–2763.
50. *Zheng Y., Rudensky A.Y.* Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage // *Nat. Immunol.* 2007. Vol. 8. P. 457–462.