

DOI: 10.15825/1995-1191-2015-3-58-64

ИЗУЧЕНИЕ *IN VITRO* ВОЗМОЖНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДНЫХ МИКРОАГРЕГАТОВ ДОНОРСКОГО РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

С.А. Борзенко^{1, 2}, И.А. Попов¹, И.Н. Сабурова^{3, 4}, П.М. Арбуханова¹

¹ Центр фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² Кафедра глазных болезней ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

³ Лаборатория клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва, Российская Федерация

⁴ Кафедра общей патологии и патофизиологии Российской академии постдипломного образования, Москва, Российская Федерация

Цель. Изучить в эксперименте *in vitro* критерии трансплантабельности многоклеточных сфероидных микроагрегатов ретинального пигментного эпителия (РПЭ), подготовленных методом 3D-клеточного культивирования. **Материалы и методы.** 11 донорских глаз (6 с показателем адреналиновой пробы «А», 5 – с показателем «В») использовали в качестве источника клеточных культур РПЭ (группа «А» – 6 культур, группа «В» – 5 культур), из которых методом трехмерного клеточного культивирования было получено свыше 2000 сфероидов РПЭ, из которых отобрали 1760 (960 – группа «А», 800 – группа «В»). Среди отобранных сфероидов было одинаковое количество сфероидов разной морфологии («гладкие» и «бахромчатые») и изначального посевного количества клеток (500, 1000, 5000, 25 000, 125 000). По 12 сфероидов группы «А» и по 10 группы «В» выводили из 3D-культуры для оценки жизнеспособности в сроки 7, 14, 21, 28 суток 3D-культивирования. Такое же количество сфероидов в те же сроки переводили из 3D-культуры в 2D-условия для оценки их адгезивных свойств. Жизнеспособность клеток в составе сфероидов определяли при помощи теста с трипановым синим. Наличие или отсутствие адгезии определяли при микроскопическом наблюдении. **Результаты.** «Гладкие» сфероиды 7 и 14 дней предтрансплантационного культивирования и посевных количеств 500 и 1000 клеток на висячую каплю показали наивысшую трансплантабельность (жизнеспособность клеток от $0,83 \pm 0,38$ до $0,94 \pm 0,24$, стопроцентная адгезия сфероидов). «Бахромчатые» сфероиды оказались нетрансплантабельны во всех вариантах, несмотря на частичное сохранение их жизнеспособности (при сравнении с «гладкими» по всем параметрам $p < 0,05$). Сроки предтрансплантационного культивирования 21 и 28 дней и высокие посевные количества клеток достоверно снижают трансплантабельность сфероидов ($p > 0,05$ для низких посевных количеств, $p < 0,05$ – для высоких). Различия в показателях адреналиновой пробы А и В донорских глаз, явившихся первичными источниками клеточного материала, на трансплантабельность сфероидов не влияют ($p > 0,05$). **Заключение.** Среди сфероидов РПЭ, получаемых по разработанной нами методике, лучшей трансплантабельностью обладают сфероиды с «гладкой» поверхностью, культивированные перед трансплантацией в 3D-условиях в течение 7–14 дней и полученные при посевных количествах 500 и 1000 клеток РПЭ на одну висячую каплю.

Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, двухмерная культура, трехмерная культура, висячая капля, сфероид, трансплантат, трансплантабельность, жизнеспособность.

Для корреспонденции: Попов Илья Андреевич. Адрес: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, 59а. Тел.: (499) 488-85-58, (916) 820-88-71. E-mail: ilya_doctor_popov@mail.ru.

For correspondence: Popov Ilya Andreevich. Address: 127486, Moscow, Beskudnikovsky boul., 59a. Tel.: (499) 488-85-58, (916) 820-88-71. E-mail: ilya_doctor_popov@mail.ru.

IN VITRO INVESTIGATION OF THE TRANSPLANTATION PROSPECTS OF MULTICELLULAR SPHEROID MICROAGGREGATES OF DONOR RETINAL PIGMENT EPITHELIUM

S.A. Borzenok^{1, 2}, I.A. Popov¹, I.N. Saburina^{3, 4}, P.M. Arbukhanova¹

¹ The Center of Fundamental and Applied Medical and Biological Problems

of the S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

² Department of Eye Diseases of A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

³ The Research Institute of General Pathology and Pathophysiology of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

⁴ Department of General Pathology and Pathophysiology of Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation

Aim. To study in experiment the criteria for transplantability of multicellular spheroid microaggregates of retinal pigment epithelium (RPE), prepared by the method of 3D cell culture. **Materials and Methods.** 11 donor eyes (6 of adrenaline index «A», 5 of index «B») were used as a source of RPE cell cultures (group «A» – 6 cultures, group «B» – 5 cultures), of which over 2000 RPE spheroids were obtained by the method of three-dimensional cell culture. 1760 spheroids of them were selected for transplantability investigation (960 – group «A», 800 – group «B»). Among the selected spheroids were equal numbers of spheroids of different morphology («smooth» and «rough») and of the initial cell seeding number (500, 1000, 5000, 25 000, 125 000 cells per hanging drop). We were taking out 12 spheroids of group «A» and 10 spheroids of group «B» of the 3D culture in terms of 7, 14, 21, 28 days of 3D culture to assess their viability. We were transferring the same number of spheroids in the same terms from 3D to 2D culture conditions to assess their adhesive properties. Viability of cells within spheroids was determined using the Trypan blue exclusion. The presence or absence of adhesion was determined by microscopic observation. **Results.** «Smooth» spheroids of 7 and 14 days of pretransplantation cultivation and derived from hanging drops containing 500 and 1000 cells showed the highest transplantability (cell viability varied from 0.83 ± 0.38 to 0.94 ± 0.24 , a 100% adhesion). «Rough» spheroids were untransplantable in all variants, despite their partial preservation of viability (in comparison to «smooth» ones $p < 0.05$). 21 and 28 days of pretransplantation culturing and high cell seeding numbers significantly lowered transplantability of obtained spheroids ($p > 0.05$ for low cell numbers, $p < 0.05$ for the high ones). Differences in adrenaline indexes A and B of donor eyes which were the primary sources of cellular material had no effect ($p > 0.05$) on resulting spheroids transplantability. **Conclusion.** Among RPE spheroids obtained by our method the spheroids cultivated in a 3D environment for 7 to 14 days prior to transplantation and derived from hanging drops containing 500 and 1000 RPE cells showed the highest transplantability.

Key words: retinal pigment epithelium, two-dimensional culture, three-dimensional culture, hanging drop, spheroid, transplant, viability.

ВВЕДЕНИЕ

Возрастная макулярная дегенерация занимает третье место в структуре слепоты и слабовидения в целом по миру, уступая катаракте и аметропиям, и первое – в возрастной категории старше 75 лет в развитых странах [1]. В то же время способы лечения данного состояния, принятые сегодня в клинической практике, обладают ограниченной эффективностью [2]. Трансплантация ретинального пигментного эпителия (РПЭ) – многообещающий метод лечения, хорошо зарекомендовавший себя в доклинических исследованиях, но встречающий ряд ограничений в клинике [3]. Существующие сегодня формы субретинальных трансплантатов РПЭ обладают недостатками – суспензия клеток может выходить в витреальную полость механиз-

мом обратного и образовывать неравномерные клеточные слои, а тканевые лоскуты предполагают более трудоемкую и травматичную технику имплантации, могут самопроизвольно сворачиваться и инкапсулироваться [4]. Ранее мы сообщали о разработке способа формирования трансплантатов РПЭ в форме многоклеточных сфероидных микроагрегатов (сфероидов), которая предположительно позволит трансплантировать аллогенный РПЭ с ограничением клеточной диссеминации внутри глаза и сохранением микроинвазивности вмешательства [5]. В настоящем исследовании мы поставили задачу – изучить в эксперименте *in vitro* критерии трансплантируемости сфероидов РПЭ, подготовленных методом 3D-клеточного культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника донорского материала мы использовали 11 донорских глаз от 11 доноров (группа «А» – 6 доноров с показателем адреналиновой пробы по С.А. Борзенку «А» [6], среднее время от момента смерти до гипотермии $6,2 \pm 1,4$ ч, средний возраст доноров $34,5 \pm 10,5$ года; группа «В» – 5 доноров с показателем «В», среднее время от момента смерти до гипотермии $8,0 \pm 2,7$ ч, средний возраст доноров $39,4 \pm 4,5$ года). После выкраивания роговично-склерального диска для трансплантации глазное яблоко погружали в чашку Петри (диаметр 10 см), заполненную питательной средой Игла в модификации Дульбекко в смеси со средой Хэма F12 (1:1; DMEM/F12, ПанЭко, Россия). Склеральную оболочку рассекали на несколько лепестков, отсепааровывали от подлежащей хороидеи путем пересечения вортикозных вен и склеральной части зрительного нерва, наносили три разреза хороидально-пигментного комплекса (ХПК) – круговой параллельно зубчатой линии в 1 мм от нее, один меридиональный по направлению к заднему полюсу и один круговой вокруг культивационного диска зрительного нерва. ХПК аккуратно отделяли от подлежащей сетчатки, переносили в чашку Петри, добавляли 2 мл смеси 0,25% раствора трипсина и раствора Версена (1:1) и инкубировали в стандартных условиях – при 37°C и 5% концентрации CO_2 (инкубатор NU-5510, NuAire, США) в течение 15 мин, после чего клетки РПЭ отделяли с поверхности мембраны Бруха струей жидкости и в виде суспензии собирали в пробирку 15 мл. Полученную суспензию центрифугировали в режиме 1800 об./мин в течение 5 мин, супернатант сливали, а полученный сгусток клеток ресуспендировали и культивировали в чашке Петри (35 мм) в CO_2 -инкубаторе, получая первичную культуру клеток РПЭ. Использовали питательную среду следующего состава: DMEM/F12 (89% по об.; ПанЭко, Россия) с добавлением сухого L-глутамина (ПанЭко, Россия), эмбриональная телячья сыворотка (10% по об.; Hyclone, США) и смесь антибиотиков (1% по об.; MPBiomedicals, LLC, США). Инкубировали в стандартных условиях, питательную среду меняли каждые 3–4 дня. Спустя 3–4 нед. проводили пассирование клеточных культур с целью наращивания клеточной массы. На 5–6-м пассаже от каждого донора получали две большие чашки Петри с конфлюэнтным монослоем клеток РПЭ. Клетки дезагрегировали смесью растворов трипсина и Версена, подсчитывали количество клеток в суспензии при помощи камеры Горяева и получали ряд висячих капель различного посевного количества клеток на одну висячую каплю, внутри которых в последующие дни культивирования в CO_2 -инкубаторе формировались сфероиды РПЭ различной морфо-

логии – с «гладкой» или с «бахромчатой» поверхностью (рис. 1, а–в).

Поскольку процесс формирования сфероидов различной морфологии пока не поддается нашему контролю и носит стохастический характер, суммарно мы получили избыточное количество сфероидов – свыше 2000, из которых было отобрано одинаковое количество сфероидов различной морфологии («гладкие» и «бахромчатые») и различных посевных количеств (по 500, 1000, 5000, 25 000, 125 000 клеток) – по 16 сфероидов каждого из 10 вариантов от 11 доноров (по 160 сфероидов от каждого донора, 1760 сфероидов всего). При выборе посевных количеств клеток для конструирования сфероидов мы опирались на данные исследований по формированию жизнеспособных сфероидов при трехмерном культивировании от нескольких сотен и тысяч [7, 8] до нескольких сотен тысяч клеток [9].

Мы использовали два критерия трансплантатбельности сфероидов – жизнеспособность составляющих сфероид клеток и адгезивные свойства сфероидов по отношению к стандартному субстрату (культуральный пластик). Первый критерий является отражением базовой функции клетки – ее способности поддерживать целостность плазматической мембраны, которая в норме непроницаема для трипанового синего. Второй критерий является отражением частной функции эпителиальной клетки – ее способности синтезировать белки адгезии интегрины. Мы исследовали трансплантатбельность сфероидов различной морфологии (гладкие и бахромчатые) и различных посевных количеств клеток.

Также мы исследовали влияние на трансплантатбельность сфероидов сроков предтрансплантационного 3D-культивирования.

По 12 сфероидов из группы А и по 10 из группы В (по 2 сфероида одного посевного количества от каждого донора) извлекали из 3D-культуры в различные сроки (7, 14, 21 и 28 дней), переносили в пробирки типа «Эппендорф» (1,5 мл) с фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) для отмывания остатков питательной среды (сфероиды одной группы смешивали в одной пробирке), затем в пробирку со смесью 0,25% трипсина-ЭДТА и Версена (1:1 по об.), инкубировали в стандартных условиях в течение 5 мин, дезагрегировали клетки пипетированием и проводили тест на жизнеспособность с трипановым синим по стандартной методике.

По 12 других сфероидов из группы А и по 10 из группы В различных посевных количеств клеток и различной морфологии извлекали из 3D-культуры в различные сроки (7, 14, 21 и 28 дней) и переносили на дно лунок 24-луночных планшетов по одному сфероиду в лунку. Начальные этапы адгезии сфероидов определяли микроскопически по прекращению их свободной флуктуации в растворе при действии

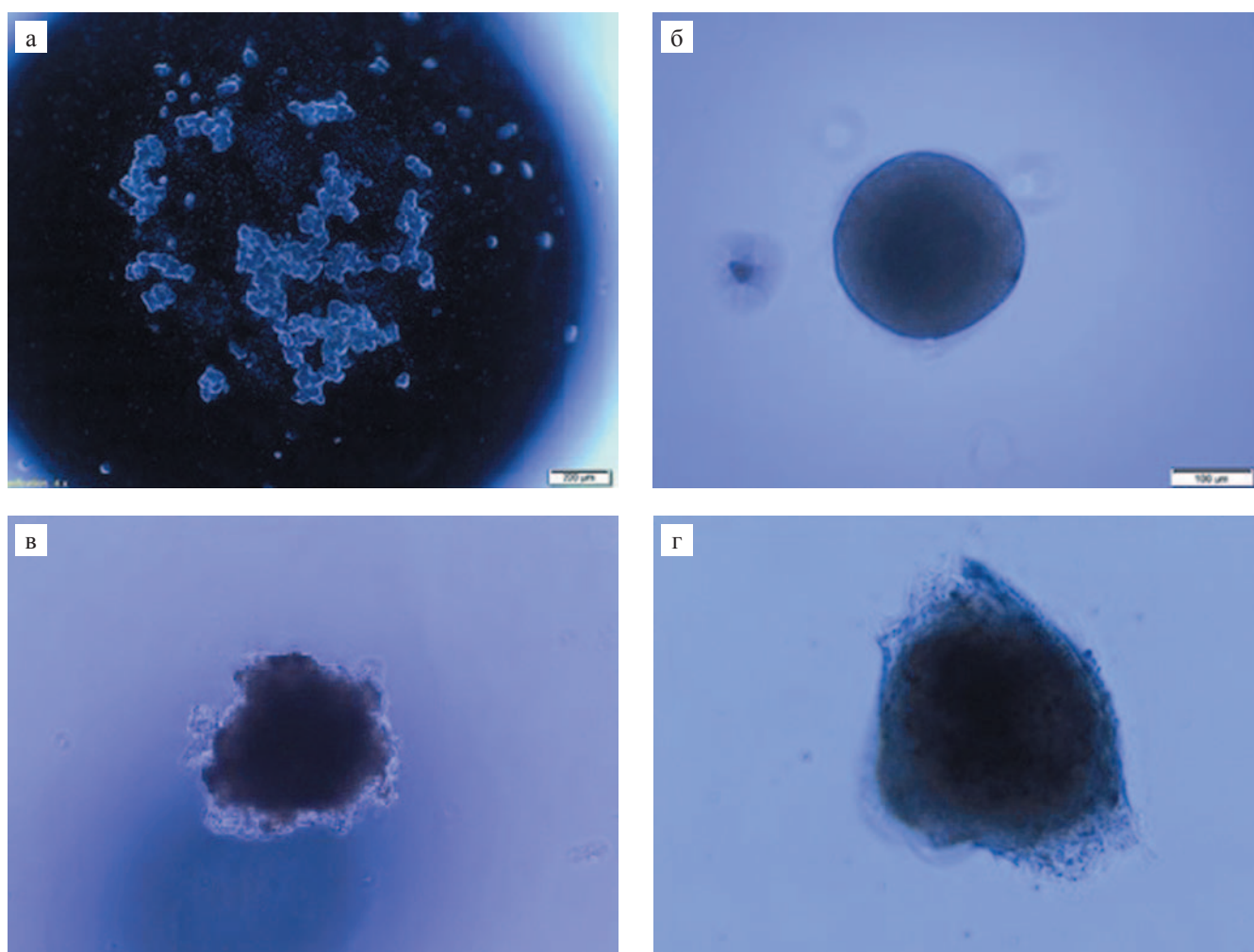


Рис. 1. 3D- и 2D-культивирование РПЭ: а – суспензия клеток РПЭ в висячей капле, 1000 клеток, 24 ч 3D-культивирования, $\times 40$; б – сфероид РПЭ с «гладкой» поверхностью в висячей капле, 1000 клеток, 7-е сут 3D-культивирования, $\times 100$; в – сфероид РПЭ с «бахромчатой» поверхностью, 5000 клеток, 7-е сут 3D-культивирования, $\times 100$; г – сфероид РПЭ, адгезировавший к поверхности субстрата; виден распространяющийся слой клеток вокруг сфероида, 2-е сут 2D-культивирования, $\times 100$

Fig. 1. 3D- and 2D-culturing of RPE: а – suspension RPE cells in hanging drop, 1000 cells, 24 hours of 3D-culturing, $\times 40$; б – «smooth» spheroids in hanging drop, 1000 cells, 7-th day of 3D-culturing, $\times 100$; в – «rough» spheroids, 5000 cells, 7-th day of 3D-culturing, $\times 100$; г – spheroid RPE adhered to surface of substrate; spreading layer of cells around the spheroid, 2-nd day of 2D-culturing, $\times 100$

низкочастотных механических колебаний (проводили тест с легкой перкуссией столешницы, на которой установлен инвертированный микроскоп) а также по появлению первых признаков распластывания (спрединга) клеточного слоя вокруг сфероида.

При сравнении различных параметров культивирования сначала проводили дисперсионный анализ статистически достоверной разницы между несколькими группами одного качества (сфероиды одного посевного количества, единой морфологии, одного срока 3D-культивирования) при помощи F-критерия Фишера, а затем для оценки более тонких различий внутри каждого качественного множества применяли метод множественного попарного сравнения с применением z-критерия для выборочных долей, поскольку каждая отдельная

группа объектов состояла из элементов, каждый из которых мог принимать одно из двух значений (мертвая клетка/живая клетка; прикрепившийся/неприкрепившийся сфероид), т. е. представляла собой выборочную долю. С учетом множественного попарного сравнения групп вводили поправку Бонферрони, так что для опровержения нулевой гипотезы на уровне 5% вероятности использовали более строгие критические значения z, соответствующие 1% вероятности справедливости нулевой гипотезы, чем при однократных сравнениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ жизнеспособности клеток в составе сфероидов с различными параметрами 3D-культивирования.

В табл. 1 представлены данные изучения жизнеспособности сфероидов с различными параметрами.

При анализе влияния времени 3D-культивирования на жизнеспособность сфероидов выяснилось, что сфероиды с большими посевными количествами клеток (25 000 и 125 000 клеток) статистически значимо снижают свою жизнеспособность к 28-му дню 3D-культивирования ($p < 0,05$). Потеря жизнеспособности замедлена у сфероидов с меньшими посевными количествами клеток (500, 1000 и 5000 клеток на висячую каплю) и у сфероидов с «гладкой» морфологией ($p > 0,05$).

При анализе влияния изначальных посевных количеств клеток на жизнеспособность сфероидов выявили, что жизнеспособность «гладких» сфероидов с посевными количествами 500 и 1000 клеток не отличается ($p > 0,05$), но достоверно уменьшается при посевных количествах 5000 клеток и более на висячую каплю ($p < 0,05$). У «бахромчатых» сфероидов разница становится достоверной при посевных количествах 25 000 клеток и более ($p < 0,05$).

При анализе зависимости морфологии сфероидов от жизнеспособности составляющих их клеток

выяснилось, что жизнеспособность «бахромчатых» сфероидов достоверно ниже жизнеспособности «гладких» ($p < 0,05$). Статистически значимое различие отсутствует между сфероидными с более высокими посевными количествами клеток (25 000 и 125 000; $p > 0,05$).

Достоверных различий между двумя группами сфероидов, отличающимися показателями адреналиновой пробы донорских глаз, явившихся первичными источниками клеточного материала, выявить не удалось ($p > 0,05$).

Анализ адгезивных свойств сфероидов с различными параметрами 3D-культивирования.

Прикрепление «гладких» сфероидов к поверхности субстрата наблюдали уже в первые сутки 2D-культивирования сфероидов (табл. 2). В то же время нам не удалось зарегистрировать ни одного случая прикрепления «бахромчатых» сфероидов.

На вторые сутки отмечали появление распространяющегося слоя РПЭ вокруг прикрепившихся сфероидов (рис. 1, г). Сфероиды с меньшими посевными количествами клеток (500, 1000 и 5000 клеток) остались прикрепленными, в то время как часть сфероидов с большими посевными количествами клеток открепились (табл. 3).

Таблица 1

**Жизнеспособность клеток, составляющих сфероиды с различными свойствами
(% жизнеспособных клеток \pm стандартное отклонение выборочной доли)**

**Cell viability, spheroids components with different properties
(% viable cells \pm standard deviation of the sample fraction)**

| Посевное количество клеток | Морфология сфероидов | Сроки предтрансплантационного 3D-культивирования, дней | | | |
|----------------------------|----------------------|--|----------|-----------|-----------|
| | | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Группа А | | | | | |
| 500 | Гладкие | 91 ± 2,9 | 85 ± 3,6 | 79 ± 4,1 | 78 ± 4,1 |
| 1000 | | 89 ± 3,1 | 86 ± 3,5 | 79 ± 4,1 | 80 ± 4,0 |
| 5000 | | 76 ± 4,3 | 69 ± 4,6 | 62 ± 4,9 | 60 ± 4,9 |
| 25 000 | | 40 ± 4,9 | 33 ± 4,7 | 29 ± 4,5 | 23 ± 4,3 |
| 125 000 | | 34 ± 4,7 | 27 ± 4,4 | 19 ± 3,9 | 13 ± 3,4 |
| 500 | Бахромчатые | 51 ± 5,0 | 46 ± 5,0 | 36 ± 4,8 | 29 ± 4,5 |
| 1000 | | 52 ± 5,0 | 43 ± 5,0 | 37 ± 4,8 | 25 ± 4,3 |
| 5000 | | 42 ± 4,9 | 35 ± 4,8 | 27 ± 4,4 | 20 ± 4,0 |
| 25 000 | | 37 ± 4,8 | 23 ± 4,2 | 17 ± 3,8 | 16 ± 3,7 |
| 125 000 | | 32 ± 4,7 | 14 ± 3,5 | 11 ± 3,1 | 9,0 ± 2,9 |
| Группа В | | | | | |
| 500 | Гладкие | 94 ± 2,4 | 86 ± 3,5 | 83 ± 3,8 | 83 ± 3,8 |
| 1000 | | 89 ± 3,1 | 83 ± 3,8 | 79 ± 4,1 | 78 ± 4,1 |
| 5000 | | 77 ± 4,2 | 67 ± 4,7 | 61 ± 4,9 | 56 ± 5,0 |
| 25 000 | | 38 ± 4,9 | 35 ± 4,8 | 28 ± 4,5 | 23 ± 4,2 |
| 125 000 | | 33 ± 4,7 | 25 ± 4,3 | 14 ± 3,5 | 14 ± 3,5 |
| 500 | Бахромчатые | 47 ± 5,0 | 39 ± 4,9 | 33 ± 4,7 | 30 ± 4,6 |
| 1000 | | 49 ± 5,0 | 42 ± 4,9 | 29 ± 4,5 | 27 ± 4,4 |
| 5000 | | 40 ± 4,9 | 35 ± 4,8 | 27 ± 4,4 | 15 ± 3,6 |
| 25 000 | | 36 ± 4,8 | 21 ± 4,1 | 8,0 ± 2,7 | 10 ± 3,0 |
| 125 000 | | 31 ± 4,6 | 16 ± 3,7 | 11 ± 3,1 | 5,0 ± 2,2 |

Таблица 2

Количество «гладких» сфероидов, адгезировавших к поверхности субстрата на первые сутки 2D-культивирования

Number of «smooth» spheroids adhere to the surface of the substrate on the first day of 2D-culturing

| Посевное количество клеток на висячую каплю | Сроки предтрансплантационного 3D-культивирования, дней | | | |
|---|--|----|----|----|
| | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Группа А | | | | |
| 500 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 1000 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 5000 | 12 | 11 | 11 | 8 |
| 25 000 | 7 | 8 | 2 | 2 |
| 125 000 | 3 | 6 | 0 | 0 |
| Группа В | | | | |
| 500 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 1000 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 5000 | 10 | 8 | 9 | 6 |
| 25 000 | 7 | 6 | 3 | 1 |
| 125 000 | 6 | 2 | 0 | 0 |

В последующие дни все прикрепившиеся сфероиды оставались прикрепленными, а новых прикреплений не наблюдалось.

При анализе достоверности различий в адгезивных свойствах сфероидов в зависимости от сроков предтрансплантационного 3D-культивирования выявили, что достоверное снижение адгезивных свойств сфероидов наблюдается в группах сфероидов с большими посевными количествами клеток (25 000 и 125 000 клеток; $p < 0,05$). В группах с меньшими посевными количествами клеток на висячую каплю достоверных изменений адгезивных свойств не выявлено (прикрепилась все сфероиды, независимо от сроков 3D-культивирования; $p > 0,05$).

При анализе достоверности различий в адгезивных свойствах сфероидов с различными посевными количествами клеток выявили, что достоверно более слабыми адгезивными свойствами обладают сфероиды с большими посевными количествами клеток (25 000 и 125 000 клеток на висячую каплю; $p < 0,05$). Сфероиды с меньшими посевными количествами (1000 и 5000 клеток) достоверных отличий от сфероидов с наименьшей посевной концентрацией (500 клеток) не имеют ($p > 0,05$).

При анализе различий в адгезивных свойствах сфероидов, полученных из донорских яблок с различными показателями адреналиновой пробы, достоверных различий выявлено не было ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование выявило наличие зависимости трансплантабельности сфероидов РПЭ

Таблица 3

Количество «гладких» сфероидов, адгезировавших к поверхности субстрата на вторые сутки 2D-культивирования

Number of «smooth» spheroids adhere to the surface of the substrate on the second day of 2D-culturing

| Посевное количество клеток на висячую каплю | Сроки предтрансплантационного 3D-культивирования, дней | | | |
|---|--|----|----|----|
| | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Группа А | | | | |
| 500 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 1000 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 5000 | 12 | 12 | 9 | 11 |
| 25 000 | 7 | 8 | 2 | 2 |
| 125 000 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| Группа В | | | | |
| 500 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 1000 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 5000 | 10 | 8 | 9 | 6 |
| 25 000 | 7 | 4 | 1 | 0 |
| 125 000 | 6 | 1 | 0 | 0 |

от трех параметров предтрансплантационного 3D-культивирования.

Во-первых, сроки 3D-культивирования более 14 дней негативно сказываются на жизнеспособности и адгезивных свойствах сфероидов – более выражено в сфероидах с большими количествами клеток, менее выражено в сфероидах с меньшими количествами. Вкупе с фактом, установленным ранее, что сфероиды РПЭ не имеют тенденции к увеличению в размерах [5] это может подтверждать гипотезу о том, что клетки РПЭ внутри сфероида не имеют тенденции к делению, общая жизнеспособность сфероида снижается необратимо, что косвенно указывает на их онкологическую безопасность.

Во-вторых, количество клеток, составляющих сфероид РПЭ, влияет на его трансплантабельность. Единичные клетки РПЭ в суспензии, как было показано ранее, претерпевают апоптоз в течение суток; однако, будучи прикрепленными к какому-либо субстрату или к таким же клеткам, они могут существовать пролонгированно [10]. Полученные нами данные согласуются с представлением о некритической гибели клеток в ядре разрастающихся сфероидов опухолевых клеток и могут быть объяснены тем, что, поскольку сфероид является бессосудистой структурой, то его максимальный стабильный размер должен ограничиваться диффузией питательных веществ.

В третьих, морфология сфероида косвенно указывает на трансплантабельность сфероидов донорского РПЭ. «Гладкая» поверхность представляется прин-

ципиальным признаком при прогнозировании приживления сфероидов к субстрату. Таким образом, в ходе трехмерного клеточного культивирования происходит естественная селекция сфероидов по трансплантабельности. Природа появляющейся на поверхности сфероидов «бахромы» (состоит ли она лишь из нежизнеспособных клеток и субклеточного дебриса или включает компоненты межклеточного матрикса) и механизм ее появления пока достоверно неизвестны и являются предметом текущих исследований. Также представляет интерес вопрос возможности адгезии «бахромчатых» сфероидов при изменении условий трансплантации (например, при механической аппланации), учитывая остаточную жизнеспособность клеток в сфероидах с «бахромой».

Четвертый изученный фактор – показатель адrenalиновой пробы донорских глаз, явившихся первичным источником донорского материала, статистически значимого влияния на свойства сфероидов не оказал. Вероятнее всего, это можно объяснить тем, что первичное культивирование и первые 2D-пассажи сами по себе являются естественным тестом на жизнеспособность, определяющим перспективы дальнейшего 3D-культивирования. Если количество жизнеспособных клеток в исходном материале недостаточно, то культура не достигает конfluence при последовательных пересевах и деградирует уже на 1–2-м пассаже. Поскольку мы имели дело со стабильными конfluence-культурами 5–6-го пассажа, исходный показатель адrenalиновой пробы не оказал статистически значимого влияния на поведение клеток в 3D-культуре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди сфероидов РПЭ, получаемых по разработанной нами методике, лучшей трансплантабельностью обладают сфероиды, полученные при посевных количествах 500 и 1000 клеток РПЭ на одну висющую каплю, культивированные перед трансплантацией в 3D-условиях в течение 7–14 дней и обладающие «гладкой» поверхностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H et al. Vision Loss Expert Group. Causes of vision loss worldwide, 1990–2010: a systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2013 Dec; 1 (6): e339–349. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70113-X.
2. Fernández-Robredo P, Sancho A, Johnen S, Recalde S, Gama N, Thumann G et al. Current treatment

- limitations in age-related macular degeneration and future approaches based on cell therapy and tissue engineering. *J Ophthalmol*. 2014; 2014: 510285. doi: 10.1155/2014/510285.
3. Binder S, Stanzel BV, Krebs I, Glittenberg C. Transplantation of the RPE in AMD. *Prog Retin Eye Res*. 2007 Sep; 26 (5): 516–554.
4. Binder S, Krebs I, Hilgers RD, Abri A, Stolba U, Assadoulina A et al. Outcome of transplantation of autologous retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration: a prospective trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Nov; 45 (11): 4151–4160.
5. Борзенко СА, Попов ИА, Островский ДС, Сабурова ИИ, Кошелева АВ, Зурина ИМ. Конструирование трансплантатов донорского ретинального пигментного эпителия методом трехмерного клеточного культивирования. Бюллетень СО РАМН. 2014, 34 (3): 42–47. Borzenok SA, Popov IA, Ostrovsky DS, Saburina IN, Kosheleva AV, Zurina IM. The Construction of Transplants of Human Cadaveric Donor Retinal Pigment Epithelium by the Method of 3D Cellular Culture. *Bulleten' SO RAMN*. 2014, 34 (3): 42–47 [In Russ, English abstract].
6. Борзенко СА. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы. Дис. ... д. м. н. М., 2008: 306. Borzenok SA. Mediko-tehnologicheskie i metodologicheskie osnovy jeffektivnoj dejatel'nosti glaznyh tkanevyh bankov Rossii v obespechenii operacij po skvoznoj transplantacii rogovicy. Dis. ... d. m. n. M., 2008: 306.
7. Sato R, Yasukawa T, Kacza J, Eichler W, Nishiwaki A, Iandiev I 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 Mar 11; 54 (3): 1740–1749.
8. Repin VS, Saburina IN, Kosheleva NV, Gorkun AA, Zurina IM, Kubatiev AA. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation *in vitro*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014; 158; 1: 137–144.
9. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*. 1973 Oct 1; 138 (4): 745–753.
10. Tezel TH, Del Priore LV. Reattachment to a substrate prevents apoptosis of human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1997 Jan; 235 (1): 41–47.

Статья поступила в редакцию 04.03.2015 г.
The article was submitted to the journal on 04.03.2015