Национальный журнал глаукома
2017, Т. 16, № 2, стр. 74-81

Russian journal of glaucoma
2017, Vol. 16, № 2, pp. 74-81

УДК 617.7-007.681: 617.735-018

Ганглиозные клетки сетчатки: возможности нейропротекции при глаукоме

Габашвили А.Н., к.б.н., научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии;
Еричев В.П., д.м.н., профессор, руководитель отдела глаукомы;
Нестерова Т.В., лаборант-исследователь лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии;
Суббот А.М., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней», *119021, Российская Федерация, Москва, ул. Россолимо, 11А, Б.*

Авторы не получали финансирование при проведении исследования и написании статьи.
Конфликт интересов: отсутствует.

Резюме

Нейропротекторная терапия является современным и одним из наиболее перспективных направлений в лечении глаукомы. Эта стратегия подразумевает защиту сетчатки, а также волокон зрительного нерва от повреждающего действия различных факторов. Клеточная терапия постепенно находит практическое применение почти во всех областях клинической медицины, в том числе и в офтальмологии. Считается, что положительное влияние трансплантации клеток обусловлено несколькими механизмами, одним из которых является трофический, поэтому одним из важных аспектов нейропротекции при глаукоме является коррекция метаболического стресса клеток сетчатки.

В обзоре анализируется современное состояние вопроса изучения ганглиозных клеток сетчатки как мишени для терапии глаукомы, дается представление о новых подходах к лечению этого заболевания с использованием клеточных технологий на основе стратегии нейропротекции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ганглиозные клетки сетчатки, глаукома, нейропротекция, внутриглазное давление, нейротрофины, стволовые клетки, клеточная терапия, инкапсулированные клетки, ИПСК.

ENGLISH

Retinal ganglion cells: potentiality for neuroprotective glaucoma treatment

Gabashvili A.N., Ph.D., Research Associate, Laboratory of Fundamental Research in Ophthalmology;
Erichev V.P., Med.Sc.D., Professor, Head of the Glaucoma Department;
Nesterova T.N., Research Assistant, Laboratory of Fundamental Research in Ophthalmology;
Subbot A.M., Ph.D., Senior Research Associate, Laboratory of Fundamental Research in Ophthalmology.

Scientific Research Institute of Eye Diseases, *11A Rossolimo st., Moscow, Russian Federation, 119021.*

Conflicts of Interest and Source of Funding: none declared.

Для контактов:
Габашвили Анна Николаевна, e-mail: gabashvili.anna@gmail.com

Поступила в печать: 08.02.2017

Received for publication: February 8, 2017

Abstract

Neuroprotective therapy is a contemporary and promising direction in glaucoma treatment. This strategy involves retinal protection, as well as the protection of optic nerve fibers from damaging by various factors. Cell therapy is gradually finding its practical application in almost all areas of clinical medicine, including ophthalmology. The positive effect of cell transplantation is associated with several mechanisms, including the trophic one and therefore, retinal cells metabolic stress correction is an important aspect of neuroprotection in glaucoma. The review analyzes the current state of researching retinal ganglion cells as targets for glaucoma therapy and gives a general idea about the new approaches to the treatment of this disease with the use of cell technologies based on neuroprotection strategies.

KEYWORDS: retinal ganglion cells, glaucoma, neuroprotection, intraocular pressure, neurotrophin, stem cells, cell therapy, encapsulated cells, induced pluripotent stem cells.

Список сокращений

ГК — ганглиозные клетки
ВГД — внутриглазное давление
ПОУГ — первичная открытоугольная глаукома
RBPMS — RNA-binding protein with multiple splicing, РНК-связывающий белок с множественным сплайсингом
RRM — RNA-recognition motif, участок распознавания РНК
Brn3 — Brain-specific homeobox/POU domain protein 3
ЭСК — эмбриональные стволовые клетки
ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
НСК — нейральные стволовые клетки
ЭТ — эмбриональные тельца
FGF — Fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов
IGF — Insulin-like growth factor, инсулиноподобный фактор роста
BMP — bone morphogenetic protein, костный морфогенетический белок
EGF — epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста
ИП — иммунопэннинг
ИМС — иммуномагнитная сепарация
ФАКС — флуоресцентно-активированный клеточный сортинг
DAPT (N-[(3,5-Difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-2-phenyl]glycine-1,1-dimethylethyl ester — (N - [(3,5-дифторфенил) ацетил]-L-аланил-2-фенил] глицин-1,1-диметиловый эфир
NGF — nerve growth factor, фактор роста нервов
BDNF — brain derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга
NT-3 — нейротрофин-3
NT-4/5 — нейротрофин-4/5
CNTF — ciliary neurotrophic factor, цилиарный нейротрофический фактор
TrkB — tropomyosin receptor kinase B, тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор В
NMDA — N-methyl-D-aspartate receptor, рецептор N-метил-D-аспартата
Ocm — oncomodulin, онкомодулин
α7 nAChRs — alpha-7 nicotinic receptor, альфа-7 никотиновый рецептор ацетилхолина
PTEN — phosphatase and tensin homolog, фосфатаза с двойной субстратной специфичностью

Глаукома — одна из основных причин необратимой слепоты во всем мире [1]. В 2010 г. насчитывалось около 8,4 миллиона человек, страдающих от слепоты, вызванной глаукомой, что составляет 21% общего числа пациентов, потерявших зрение. По прогнозам к 2020 г. число таких больных может возрасти до 79,6 миллионов человек [2]. Глаукома является прогрессирующим заболеванием с неясной этиологией и сложным патогенезом, с разнообразными симптомами; приводит к необратимой слепоте и слабовидению. По версии Европейского глаукомного общества, глаукома — это «хроническая прогрессирующая оптическая нейропатия, которая объединяет группу заболеваний с характерными морфологическими изменениями головки зрительного нерва (экскавация) и слоя нервных волокон сетчатки при отсутствии другой офтальмопатологии» [3]. Одной из особенностей первичной глаукомы является неопределенный по времени разрыв между «здоровьем» и «болезнью», что делает практически невозможной своевременную диагностику этого заболевания. Еще до клинической манифестации глаукомы основными ранними признаками являются дегенерация и апоптоз ганглиозных клеток сетчатки (ГК) и их аксонов, что приводит к развитию оптической нейропатии и выпадению полей зрения. При прогрессировании болезнь поражает ядра латеральных коленчатых тел таламуса и зрительной коры [4]. Одним из основных этиологических факторов глаукомы считается увеличение внутриглазного давления (ВГД). Повышенное ВГД влечет за собой появление признаков структурного повреждения головки зрительного нерва, таких как истончение нейроретинального пояска, экскавация диска зрительного нерва (ДЗН) и секторальное истончение слоя нервных волокон сетчатки [5]. При прогрессировании заболевания поражение постепенно распространяется на всю сетчатку.

Этиологически выделяют врожденную, первичную и вторичную глаукому. Врожденная глаукома генетически детерминирована или обусловлена заболеваниями в период эмбрионального развития или родов. Она проявляется в первые три года жизни. Первичная глаукома имеет генетическую природу и мульфакториальные причины развития. Вторичная глаукома является следствием болезней глаза или общих заболеваний, имеющих офтальмологические проявления.

Классификационная форма глаукомы определяется анатомическим строением угла передней камеры (открытоугольная или закрытоугольная глаукома). Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) может протекать как с высоким, так и с низким ВГД. По разным данным, до 60% пациентов страдают так называемой нормотензивной глаукомой [6].

Широкое признание получает тот факт, что у некоторых пациентов (до 20%) даже значительное снижение ВГД недостаточно для предотвращения потери зрения. Именно поэтому помимо снижения ВГД активно разрабатываются альтернативные способы терапии, направленные на другие факторы, участвующие в патологическом процессе при глаукоме. Одним из таких подходов является нейропротекторная терапия, основная цель которой — предотвращение гибели ГК и коррекция имеющихся метаболических нарушений в сетчатке.

Общая характеристика ГК

Ганглиозные клетки сетчатки представляют собой нейроны, расположенные вблизи внутренней поверхности (слой ГК) сетчатки. Эти клетки получают информацию от фоторецепторов через два типа вставочных нейронов: биполярные клетки сетчатки и амакринные клетки. В виде потенциала действия информация передается от ГК в таламус, гипоталамус и средний мозг. Считается, что в сетчатке имеется около 0,7-1,5 млн ГК [7]. Аксоны ГК формируют зрительный нерв. При этом у большинства млекопитающих аксоны ГК не имеют миелиновой оболочки в тех участках, где они проходят через сетчатку. Однако части аксонов, которые находятся за пределами сетчатки, миелинизированы. Такое устройство объясняется тем, что миелин оптически непрозрачен, и в случае его наличия в сетчатке часть света поглощалась бы, не достигая слоя фоторецепторов, что снижало бы качество зрения [8].

Биология развития

У человека ГК начинают закладываться между 5 и 18 неделями внутриутробного развития [9]. К 6-8 неделе ГК начинают дифференцироваться и мигрировать из внутреннего нейробластного слоя вдоль отростков клеток Мюллера по направлению к внутренней пограничной мембране, где к 14 неделе начинает образовываться слой ГК [10]. Постепенно ГК «отращивают» аксоны, которые в дальнейшем будут формировать зрительный нерв, при этом группы соседних ГК и их аксоны отграничены друг от друга отростками клеток Мюллера [11]. При дальнейшем развитии слоя ГК плотность клеток в нем падает, количество ГК уменьшается с 2,2-2,5 до 1,5-1,7 млн [12]. Показано, что в процессе внутриутробного развития теряется около 70% аксонов зрительного нерва [13].

При использовании различных методов, позволяющих оценить количество ГК и их плотность [14], а также число аксонов зрительного нерва [15] во взрослом организме, было установлено, что эти параметры остаются достаточно стабильными на протяжении всей жизни. Согласно некоторым исследованиям, диаметр пучков аксонов ГК в височной стороне макулы составляет ~ 60 мкм [16]. Интересным фактом является то, что во взрослом организме эти пучки по-прежнему отделены друг от друга отростками клеток Мюллера [11].

Типы ганглиозных клеток сетчатки

Все ГК имеют несколько общих свойств. За редким исключением, их тела располагаются в слое ганглиозных клеток, дендриты находятся во внутреннем плексиформном слое. Эти клетки генерируют потенциалы действия, синаптическая передача сигнала происходит путем высвобождения глутамата. Все ГК экспрессируют комплекс молекулярных маркеров, таких как белок клеточной поверхности Thy1 [17], фактор транскрипции Brn3 [18], РНК-связывающий белок RBPMS [19].

Тем не менее популяция ГК во многих отношениях неоднородна. В ранних работах были показаны отличия между ГК с on- и off-центрами, которые более эффективно соответственно отвечают на увеличение или уменьшение интенсивности света [20]. В течение следующего десятилетия было описано еще более 10 типов ГК, обнаружена связь между функциями ГК, их морфологией и физиологией [21, 22]. Кроме того, рутинным методом стала молекулярная классификация клеточных типов [23]. На настоящий момент, приняв во внимание морфологические, физиологические и молекулярные критерии, можно выделить по крайней мере 25 разных типов ГК, например, у мыши, и около 20 типов — у человека [24].

Характерные маркеры ганглиозных клеток сетчатки и их функции

Существует несколько достоверных маркеров, при помощи которых возможно идентифицировать ГК среди других клеточных типов. К таким маркерам относятся белки RBPMS, Thy1 (CD90) и Brn3 [25].

RBPMS — это член RRM семейства (RNA recognition motif, РНК-распознающий мотив) РНК-связывающих белков, имеющий один домен RRM на С-конце. Белки семейства RRM, как правило, участвуют в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне: процессинге пре-мРНК (сплайсинг, кэпирование и полиаденилирование), стабилизации РНК, ее транспорте и регулировании трансляции [19], однако функция RBPMS до сих пор точно не установлена. Тем не менее было показано, что наличие этого белка в аксонах ГК является необходимым условием для успешного образования ими синаптических связей [26].

Еще одним маркером ГК является Thy1 или, в другой классификации, CD90 — гликопротеин клеточной поверхности весом 25-37 кД, широко экспрессированный в ЦНС (как в нейрональных, так и в глиальных клетках) [27]. О функциях Thy1 в ГК также известно немного. Есть сведения о том, что уровень экспрессии мРНК этого белка снижается при повреждении сетчатки [28].

Три члена семейства факторов транскрипции Brn3 (Brain-specific homeobox/POU domain protein 3) — Brn3a, Brn3b и Brn3c — отвечают за правильное развитие ГК, а также регулируют транскрипцию друг друга [18]. Эти факторы экспрессируются в ГК

в различной степени, к примеру, Brn3c имеется в 10-20% ГК [29]. В процессе развития ГК Brn3b начинает экспрессироваться на 10-11-й день развития эмбриона, а затем, начиная с 12 дня, начинают экспрессироваться Brn3a и Brn3c [30].

Источники и технологии выделения ГК

Для изучения функционирования и поиска способов воздействия на ГК их выращивают in vitro. Существует принципиальное различие в постановке таких экспериментов. В одном случае ГК для исследования получают от донора, в другом — их дифференцируют из клеток-предшественников.

На сегодняшний день технология дифференцировки из менее коммитированных клеточных типов и получение популяции ГК из плюрипотентных стволовых клеток (эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)) достигло определенных успехов.

Как правило, вначале инициируется дифференцировка суспензионной культуры ЭСК с формированием эмбриональных телец (ЭТ) или нейросфер. ЭТ представляют собой клеточные агрегаты, состоящие из смеси эндодермальных, мезодермальных и эктодермальных клеток-предшественников, то есть представителей всех трех зародышевых листков [31]. Нейросферы — это клеточные конгломераты, состоящие из нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСК/НПК), которые способны дифференцироваться в нейральном или глиальном направлениях [32].

Общим подходом к генерации ГК in vitro является направленная дифференцировка с использованием специфических факторов роста для того, чтобы имитировать молекулярные сигналы, которые получают клетки от своего окружения в процессе ретиногенеза [33]. Ретиногенез представляет собой сложный, высокорегулируемый процесс с участием нескольких сигнальных путей, в которые включены фактор роста фибробластов (FGF) [34, 35], инсулиноподобный фактор роста (IGF) [36], костный морфогенетический протеин (BMP) [37, 38]. Кроме того, в процесс ретиногенеза вовлечен сигнальный путь Wnt [39]. Используя сочетание малых молекул и/или факторов роста для модуляции сигнальных путей, ЭСК могут быть прямо дифференцированы в ГК. Факторы, добавляемые к ростовым средам для индукции дифференцировки, включают FGF2, IGF1, EGF, ингибитор Wnt-сигнального пути Dickkopf1 (DKK1) и другие. Кроме того, используются такие добавки, как N2 [40, 41] и B27[40, 42].

До недавнего времени в большинстве экспериментов использовались ЭСК или ИПСК мыши. Для индукции дифференцировки мышиных ЭСК в ГК часто используют FGF2 [43, 44]. А для индукции дифференцировки ИПСК мыши по направлению к ГК применяется DAPT (N-[(3,5-Difluorophenyl) acetyl]-L-alanyl-2-phenyl]glycine-1,1-dimethylethyl ester) — блокатор сигнального пути Notch. При этом получившиеся ГК экспрессируют белки, регулирующие развитие ГК — Math5, Brn3b и Thy1 [40].

Со временем было показано, что обработка полученных из ЭСК человека ЭТ комбинацией факторов DKK1 и IGF1 индуцирует в клетках экспрессию белков, характерных для нейрональных клеток — ELAV3/4, NEFM и TUBB3 [45]. Кроме того, было показано, что полученные таким образом ГК имеют функционально активные глутаматные рецепторы, что также подтверждает их «зрелость».

Другим способом получения ГК является прямое репрограммирование посредством генетических модификаций, вызывающих увеличение экспрессии факторов транскрипции, имеющих ключевое значение для развития ГК. Например, повышение экспрессии такого фактора, как Pax6, стимулирует развитие ЭСК и ИПСК мыши в направлении ГК [41, 46]. Кроме того, сообщается, что увеличение уровня экспрессии факторов Atoh7/Math5 ведет к индукции дифференцировки в ГК мышиных ИПСК, полученных из фибробластов [40]. Также известно, что повышение экспрессии фактора Rax в ЭСК мыши способствует дифференцировке этих клеток в нейрональном направлении при их совместном культивировании с эксплантами сетчатки [47].

Как и в случае с другими клеточными типами, исследователи стремятся к унификации, поэтому работа с постоянными клеточными линиями является предпочтительной. В связи с этим отдельного упоминания стоит клеточная линия RGC-5. Изначально считалось, что RGC-5 — это клон иммортализованных ГК сетчатки глаза крысы, полученных в 2001 г. Krishnamoorthy et al. путем аденовирусной трансдукции культуры клеток сетчатки новорожденных крыс. Авторы заявляли, что полученные клетки 5-го клона экспрессируют такие маркеры ГК, как Brn3 и Thy1 [48]. Вначале клетки линии RGC-5 рассматривались как полезный инструмент и широко использовались в офтальмологических исследованиях в качестве модели для изучения нейробиологии ГК. До сих пор в библиотеке PubMed существует более 200 публикаций, в которых эта клеточная линия была использована в качестве модельной системы. Однако в 2009 г. у Van Bergen et al. возникли сомнения в достоверности данных, полученных группой Krishnamoorthy, и была опубликована статья [49], в которой авторы заново охарактеризовали клетки RGC-5. Путем анализа митохондриальной и ядерной ДНК было показано, что клетки являются мышиными, а не крысиными. Кроме того, клетки не были позитивны по таким маркерам ГК, как Thy1 и нейрофиламент. Единственное, что подтверждалось — эти клетки имеют несколько общих свойств с нейральными прогениторными клетками мыши, но определенно не имеют никакого отношения к ГК сетчатки. Насколько известно, лаборатория, представившая линию RGC-5, не дала каких-либо комментариев после выхода статьи Van Bergen.

При необходимости работать с ГК существует еще один путь — получение клеток из сетчатки взрослых доноров. На сегодняшний день существует несколько техник, при помощи которых возможно

это осуществить. Три самых распространенных метода — иммунопэннинг (ИП), иммуномагнитная сепарация (ИМС) и флуоресцентно-активированный клеточный сортинг (ФАКС).

Метод пэннинга основан на том, что суспензию клеток, полученную путем ферментативной диссоциации сетчатки, помещают на чашки Петри с предварительно нанесенными на них антителами к специфическим антигенам ГК. Таким образом, клетки, оставшиеся на чашке Петри после промывки, и являются искомыми ГК [50, 51].

При иммуномагнитной сепарации к клеточной суспензии добавляют магнитные микросферы, которые также несут на себе антитела против специфических маркеров ГК (например, CD90). При этом происходит связывание клеток и магнитных сфер и, после внесения полученной суспензии в магнитное поле сепаратора, магнитно меченые CD90+ ГК адгезируются к стенкам пробирки и сохраняются в колонке, а немеченые — остаются в надосадочной жидкости [52, 53].

Для клеточного сортинга также необходимо добавить к суспензии клеток антитела к специфическим маркерам, однако в этом случае антитела должны быть конъюгированы с флуоресцентной меткой. Те клетки, с которыми связались флуоресцентно меченые антитела, будут отсортированы, а не меченые клетки — удалены [54, 55].

Метод ИП широко используется для выделения ГК. Существуют данные, свидетельствующие о том, что чистота популяции ГК, изолированных при помощи этого метода, может составлять от 50 до 99,5%. Однако при этом возможна несущественная контаминация ГК клетками других фракций. Следовательно, такой способ выделения подходит только для экспериментов, в которых присутствие небольшого количества клеток других фракций может быть проигнорировано без какого-либо очевидного влияния на экспериментальные данные [56, 57].

Метод ИМС, предложенный Hong et al. [53], является более быстрым и менее сложным, чем метод ИП, и имеет более высокую чистоту выделения. Однако ГК, полученные таким способом, имеют меньшую жизнеспособность, а стоимость такого выделения выше по сравнению с ИП.

Преимущество проточной цитометрии в том, что за короткое время клетки могут быть подвергнуты скринингу на большое количество антигенов и одновременно разделены на субпопуляции и даже отдельные клетки [58], однако жизнеспособность клеток при этом также падает.

Основной проблемой является то, что, несмотря на возрастание мощностей современной науки, выход клеток после выделения остается крайне низким. Кроме этого, как и со всеми клетками нейрального ряда, культивирование ГК сопряжено с определенными трудностями, такими как ограниченная возможность к пролиферации, чувствительность клеток к составу среды и субстрату подложки, необходимость поддержки ростовыми факторами, плохая переносимость пассажей и другие.

Использование ганглиозных клеток для исследования механизмов нейропротекции

Несмотря на все вышеперечисленные сложности, культура ГК остается полезным инструментом для проведения ряда исследований в области офтальмологии, например, тестирования нейропротекторов. Известно, что ГК чувствительны к глутамату, и возрастание его концентрации может привести к гибели клеток. В одной из работ на культуре ГК крысы, полученных методом ИП, было исследовано действие препарата бис-7-такрин (ингибитор ацетилхолинэстеразы) на выживаемость клеток при повреждении, вызванном добавлением высоких концентраций глутамата [59]. Было выяснено, что препарат оказывает нейропротекторный эффект в случае его преинкубации с клетками. Позже эти данные были подтверждены в экспериментах in vivo [60].

В другом исследовании, проводимом на крысиных ГК, оценивали нейропротекторные эффекты блокаторов кальциевых каналов, таких как ганидипин, нимодипин и ломеризин. Было установлено, что при применении этих препаратов жизнеспособность ГК, культивируемых в условиях гипоксии, существенно возрастала [61].

Относительно недавней нейропротекторной стратегией является индукция активации альфа-7 никотиновых рецепторов ацетилхолина (α7 nAChRs) в сетчатке. В головном мозге активация этих рецепторов связана с реализацией нейропротекторных механизмов при некоторых заболеваниях, например, при болезни Альцгеймера [62]. На культурах ГК свиньи и крысы было показано, что гибель ГК, обусловленную глутаматной эксайтотоксичностью, можно предотвратить путем активации α7 nAChRs, причем этот эффект является дозозависимым и может быть нивелирован при использовании антагониста α7 nAChRs — алкалоида метилкаконитина [63-65].

Еще одним исследуемым препаратом стал цитиколин, относящийся к группе ноотропов. Существуют данные, что ГК в смешанной и тканевой культуре, предварительно инкубированные с цитиколином, сохраняют более высокую жизнеспособность при эксайтотоксическом повреждении клеток, например, при гиперактивации под действием нейромедиаторов, приводящей к апоптозу [66].

Как известно, в процессе развития сетчатки важную роль играют нейротрофины — трофические молекулы, оказывающие мощный эффект на выживаемость нейронов ЦНС. Эти пептиды способствуют выживанию ГК, гибнущих при повышении ВГД. В группу нейротрофинов входят несколько основных пептидов, таких как фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), нейротрофический фактор мозга (brain derived neurotrophic factor, BDNF), нейротрофин-3 (NT-3), нейротрофин-4/5 (NT-4/5) [67]. Таким образом, нейротрофины также можно рассматривать в качестве нейропротекторов.

Например, было показано, что цилиарный нейротрофический фактор (ciliary neurotrophic factor, CNTF) повышает выживаемость ГК крысы при долговременном культивировании [36]. В другой работе, выполненной на культуре ГК крысы, в качестве нейропротектора при повреждении клеток, вызванном гипергликемией, исследовался BDNF. Было обнаружено, что при культивировании ГК в условиях гипергликемии добавление BDNF снижает уровень апоптозов. Авторы полагают, что механизм этого действия основан на том, что BDNF способствует увеличению экспрессии тропомиозиновых тирозинкиназных рецепторов B (TrkB) — компонента сигнального пути TrkB-ERK/MAPK, ответственного за выживаемость нейронов [68]. Как сказано выше, одним из важнейших нейротрофических факторов является NGF. Известно, что к секреции этого фактора способны некоторые типы стволовых клеток, такие как мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани [69] и стволовые клетки пульпы зуба [70]. В некоторых исследованиях показано, что нейропротективный эффект in vitro, обусловленный NGF, может быть реализован не только прямым добавлением NGF к культуре ГК, но и при совместном культивировании ГК со стволовыми клетками, обеспечивающими трофическую поддержку [71]. Интересным является то, что нейротрофины, синтезирующиеся стволовыми клетками, могут обеспечивать поддержку не только ГК, но и других клеток сетчатки, например, клеток фоторецепторов, что нашло подтверждение в клинических исследованиях [72].

В некоторых работах изучались нейропротекторные свойства агонистов адренорецепторов, например, бримонидина (селективный агонист альфа-2-адренорецепторов). Было показано, что бримонидин стимулирует рост аксонов ГК из эксплантов сетчатки in vitro [73]. Существует предположение, что бримонидин способствует выживаемости ГК путем взаимодействия с альфа-2-адренорецептами, блокируя NMDA-рецепторы и снижая накопление внеклеточного глутамата. В пользу этой гипотезы свидетельствует то, что при совместном применении бримонидина и антагонистов альфа-2-адренорецепторов протективный эффект снижается [74, 75].

Наконец, наиболее сложным, но и наиболее интересным аспектом изучения ГК являются исследования in vivo. В силу того, что зрительный нерв не способен восстановиться после повреждения самостоятельно, в качестве подходов к терапии остаются либо стимуляция регенерации ГК извне (трофический подход), либо трансплантация непосредственно ГК/стволовых клеток-предшественников с целью замещения утраченных клеток. Однако прежде чем заместительный подход может быть рассмотрен и транслирован в клинику, предстоит решить ряд проблем. Вполне вероятно, что простой трансплантации клеток будет недостаточно, чтобы восстановить зрительные функции.

Существуют исследования, в которых показано, что возможно инициировать регенерацию аксонов зрительного нерва извне, путем комбинации нескольких терапевтических подходов. Например, инъекция зимозана (препарат, индуцирующий воспаление) вызывает миграцию воспалительных клеток в глаз. Эти клетки секретируют oncomodulin (Ocm) и другие факторы роста, которые возвращают ГК к состоянию активного роста. Кроме того, путем введения адено-ассоциированного вируса Cre (AAV2-Cre), имеющего высокую тропность к ГК, производилось специфическое выключение гена-онкосупрессора PTEN (phosphatase and tensin homolog), что потенциировало рост аксонов [76]. Однако, к сожалению, такой подход неприемлем в клинических исследованиях из-за риска опухолевой трансформации.

На сегодняшний день разработана технология «инкапсулированных клеток» (NT-501), позволяющая обеспечить доставку CNTF к клеткам сетчатки. Система представляет собой генетически модифицированные клетки пигментного эпителия сетчатки человека (клеточная линия НТК-200), инкапсулированные в полиэтилентерефталатный скаффолд, который имплантируется в стекловидное тело. Клетки способны секретировать рекомбинантный человеческий CNTF, поддерживая его высокую концентрацию в течение длительного периода времени. При этом секретируемые молекулы выделяются из капсулы через полупроницаемую мембрану из полых волокон. Таким образом, устройство защищает введенные чужеродные клетки от иммунного ответа организма хозяина [77, 78].

Обнадеживающие результаты по трансплантации клеток-предшественников ГК были получены на трансгенных животных с дегенерацией зрительного нерва [79]. В этом исследовании предшественники ГК из эмбриональной сетчатки были трансплантированы взрослым мышам в интравитреальное пространство. Было показано, что трансплантированные клетки частично дифференцировались в ГК и способствовали восстановлению аксонов зрительного нерва.

Как было отмечено выше, некоторые типы стволовых клеток способны секретировать нейротрофины, обеспечивая тем самым трофическую поддержку ГК при совместном культивировании. Такой подход может быть реализован и in vivo. Было показано, что генетически измененные МСК, секретирующие BDNF, частично восстанавливают функцию зрительного нерва при трансплантации крысам с повышенным ВГД [80]. Кроме того, в недавнем исследовании нейральные прогениторные клетки человека, секретирующие IGF-1, после интравитреальной инъекции успешно достигали внутреннего слоя сетчатки, обеспечивая выживаемость ГК и рост нейритов этих клеток у мышей.

Заключение

Результаты экспериментальных и первых клинических исследований лечения глаукомы на основе стратегии нейропротекции показали, что клеточная терапия является весьма перспективным

направлением современной офтальмологии. И, несмотря на методические и технические ограничения в проведении экспериментальных исследований на культуре ганглиозных клеток in vitro и на модельных животных, такой подход к изучению патогенеза и возможного терапевтического воздействия можно считать многообещающим.

Литература/References

1. Kingman S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally. *Bull World Health Organ* 2004; 82(11):887-888. doi: S0042-96862004001100019.
2. Quigley H.A., Broman A.T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(3):262-267. doi: 10.1136/bjo.2005.081224.
3. Blanco A.A., Bagnasco L., Bagnis A., Barton K., Baudouin C., Bengtsson B. et al. Terminology and Guidelines For Glaucoma. 4th edition. 2014: European Glaucoma Society.
4. Kaushik S., Pandav S.S., Ram J. Neuroprotection in glaucoma. *J Postgrad Med* 2003; 49(1):90-95.
5. Chang E.E., Goldberg J.L. Glaucoma 2.0: neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement. *Ophthalmology* 2012; 119(5): 979-986. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.11.003.
6. Dielemans I., Vingerling J.R., Wolfs R.C., Hofman A., Grobbee D.E., de Jong P.T. The prevalence of primary open-angle glaucoma in a population-based study in The Netherlands. The Rotterdam Study. *Ophthalmology* 1994; 101(11):1851-1855.
7. Watson A.B. A formula for human retinal ganglion cell receptive field density as a function of visual field location. *J Vis* 2014; 14(7). doi: 10.1167/14.7.15.
8. Villegas G.M. Electron microscopic study of the vertebrate retina. *J Gen Physiol* 1960; 43(6)Suppl: 15-43.
9. Pacal M., Bremner R. Induction of the ganglion cell differentiation program in human retinal progenitors before cell cycle exit. *Dev Dyn* 2014; 243(5):712-729. doi: 10.1002/dvdy.24103.
10. Provis J.M., Billson F.A., Russell P. Ganglion cell topography in human fetal retinae. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24(9):1316-1320.
11. Radius R.L., Anderson D.R. The histology of retinal nerve fiber layer bundles and bundle defects. *Arch Ophthalmol* 1979; 97(5):948-950.
12. Provis J.M., van Driel D., Billson F.A., Russell P. Development of the human retina: patterns of cell distribution and redistribution in the ganglion cell layer. *J Comp Neurol* 1985; 233(4):429-451. doi: 10.1002/cne.902330403.
13. FitzGibbon T. The human fetal retinal nerve fiber layer and optic nerve head: a DiI and DiA tracing study. *Vis Neurosci* 1997; 14(3):433-447.
14. Harman A., Abrahams B., Moore S., Hoskins R. Neuronal density in the human retinal ganglion cell layer from 16-77 years. *Anat Rec* 2000; 260(2):124-131.
15. Jonas J.B., Muller-Bergh J.A., Schlotzer-Schrehardt U.M., Naumann G.O. Histomorphometry of the human optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(4):736-744.
16. Vrabec F. The temporal raphe of the human retina. *Am J Ophthalmol* 1966; 62(5):926-938.
17. Barnstable C.J., Drager U.C. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 1984; 11(4):847-855.
18. Badea T.C., Cahill H., Ecker J., Hattar S., Nathans J. Distinct roles of transcription factors brn3a and brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron* 2009; 61(6):852-864. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.020.
19. Rodriguez A.R., de Sevilla Muller L.P., Brecha N.C. The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 2014; 522(6):1411-1443. doi: 10.1002/cne.23521.
20. Kuffler S.W. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J Neurophysiol* 1953; 16(1):37-68.
21. Famiglietti E.V. Jr., Kaneko A., Tachibana M. Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina. *Science* 1977; 198(4323):1267-1269.
22. Famiglietti E.V., Jr., Kolb H. Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science* 1976; 194(4261):193-195.
23. Karten H.J., Brecha N. Localization of neuroactive substances in the vertebrate retina: evidence for lamination in the inner plexiform layer. *Vis Res* 1983; 23(10):1197-1205.
24. Roska B.M.M. The retina dissects the visual scene in distinct features. *The New Visual Neurosciences* 2014:163-182.
25. Kwong J.M., Caprioli J., Piri N. RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(2):1052-1058. doi: 10.1167/iovs.09-4098.
26. Hornberg H., Wollerton-van Horck F., Maurus D., Zwart M., Svoboda H., Harris W.A. et al. RNA-binding protein Hermes/RBPMS inversely affects synapse density and axon arbor formation in retinal ganglion cells in vivo. *J Neurosci* 2013; 33(25):10384-10395. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5858-12.2013.
27. Kemshead J.T., Ritter M.A., Cotmore S.F., Greaves M.F. Human Thy-1: expression on the cell surface of neuronal and glial cells. *Brain Res* 1982; 236(2):451-461.
28. Ahmed F., Brown K.M., Stephan D.A., Morrison J.C., Johnson E.C., Tomarev S.I. Microarray analysis of changes in mRNA levels in the rat retina after experimental elevation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(4):1247-1258.
29. Badea T.C., Nathans J. Morphologies of mouse retinal ganglion cells expressing transcription factors Brn3a, Brn3b, and Brn3c: analysis of wild type and mutant cells using genetically-directed sparse labeling. *Vision Res* 2011; 51(2):269-279. doi: 10.1016/j.visres.2010.08.039.
30. Xiang M., Zhou L., Macke J.P., Yoshioka T., Hendry S.H., Eddy R.L. et al. The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci* 1995; 15(7 Pt 1):4762-4785.
31. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; 6(2):88-95.
32. Reynolds B.A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255(5052):1707-1710.
33. Kahn A.J. Ganglion cell formation in the chick neural retina. *Brain Res* 1973; 63:285-290.
34. de Iongh R., McAvoy J.W. Spatio-temporal distribution of acidic and basic FGF indicates a role for FGF in rat lens morphogenesis. *Dev Dyn* 1993; 198(3):190-202. doi: 10.1002/aja.1001980305.
35. Patel A., McFarlane S. Overexpression of FGF-2 alters cell fate specification in the developing retina of Xenopus laevis. *Dev Biol* 2000; 222(1):170-180. doi: 10.1006/dbio.2000.9695.
36. Meyer-Franke A., Kaplan M.R., Pfrieger F.W., Barres B.A. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 1995; 15(4):805-819.
37. Zuber M.E., Gestri G., Viczian A.S., Barsacchi G., Harris W.A. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 2003; 130(21):5155-5167. doi: 10.1242/dev.00723.
38. Lan L., Vitobello A., Bertacchi M., Cremisi F., Vignali R., Andreazzoli M., et al. Noggin elicits retinal fate in Xenopus animal cap embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(9):2146-2152. doi: 10.1002/stem.167.
39. Ouchi Y., Tabata Y., Arai K., Watanabe S. Negative regulation of retinal-neurite extension by beta-catenin signaling pathway. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 19):4473-4483. doi: 10.1242/jcs.02575.
40. Chen M., Chen Q., Sun X., Shen W., Liu B., Zhong X. et al. Generation of retinal ganglion-like cells from reprogrammed mouse fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(11):5970-5978. doi: 10.1167/iovs.09-4504.
41. Suzuki N., Shimizu J., Takai K., Arimitsu N., Ueda Y., Takada E. et al. Establishment of retinal progenitor cell clones by transfection with Pax6 gene of mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Neurosci Lett* 2012; 509(2):116-120. doi: 10.1016/j.neulet.2011.12.055.
42. Parameswaran S., Balasubramanian S., Babai N., Qiu F., Eudy J.D., Thoreson W.B. et al. Induced pluripotent stem cells generate both retinal ganglion cells and photoreceptors: therapeutic implications in degenerative changes in glaucoma and age-related macular degeneration. *Stem Cells* 2010; 28(4):695-703. doi: 10.1002/stem.320.
43. Aoki H., Hara A., Niwa M., Motohashi T., Suzuki T., Kunisada T. Transplantation of cells from eye-like structures differentiated from embryonic stem cells in vitro and in vivo regeneration of retinal ganglion-like cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246(2):255-265. doi: 10.1007/s00417-007-0710-6.

44. Jagatha B., Divya M.S., Sanalkumar R., Indulekha C.L., Vidyanand S., Divya T.S. et al. In vitro differentiation of retinal ganglion-like cells from embryonic stem cell derived neural progenitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380(2): 230-235. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.038.
45. Lamba D.A., Karl M.O., Ware C.B., Reh T.A. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(34):12769-12774. doi: 10.1073/pnas.0601990103.
46. Kayama M., Kurokawa M.S., Ueda Y., Ueno H., Kumagai Y., Chiba S. et al. Transfection with pax6 gene of mouse embryonic stem cells and subsequent cell cloning induced retinal neuron progenitors, including retinal ganglion cell-like cells, in vitro. *Ophthalmic Res* 2010; 43(2):79-91. doi: 10.1159/000247592.
47. Tabata Y., Ouchi Y., Kamiya H., Manabe T., Arai K., Watanabe S. Specification of the retinal fate of mouse embryonic stem cells by ectopic expression of Rx/rax, a homeobox gene. *Mol Cell Biol* 2004; 24(10):4513-4521.
48. Krishnamoorthy R.R., Agarwal P., Prasanna G., Vopat K., Lambert W., Sheedlo H.J. et al. Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 86(1-2):1-12.
49. Van Bergen N.J., Wood J.P., Chidlow G., Trounce I.A., Casson R.J., Ju W.K. et al. Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(9):4267-4272. doi: 10.1167/iovs.09-3484.
50. Winzeler A., Wang J.T. Purification and culture of retinal ganglion cells from rodents. *Cold Spring Harb Protoc* 2013; 2013(7): 643-652. doi: 10.1101/pdb.prot074906.
51. Barres B.A., Silverstein B.E., Corey D.P., Chun L.L. Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* 1988; 1(9):791-803.
52. Shoge K., Mishima H.K., Mukai S., Shinya M., Ishihara K., Kanno M. et al. Rat retinal ganglion cells culture enriched with the magnetic cell sorter. *Neurosci Lett* 1999; 259(2):111-114.
53. Hong S., Iizuka Y., Kim C.Y., Seong G.J. Isolation of primary mouse retinal ganglion cells using immunopanning-magnetic separation. *Mol Vis* 2012; 18:2922-2930.
54. Chintalapudi S.R., Djenderedjian L., Stiemke A.B., Steinle J.J., Jablonski M.M., Morales-Tirado V.M. Isolation and molecular profiling of primary mouse retinal ganglion cells: comparison of phenotypes from healthy and glaucomatous retinas. *Front Aging Neurosci* 2016; 8:93. doi: 10.3389/fnagi.2016.00093.
55. Amos P.J., Cagavi Bozkulak E., Qyang Y. Methods of cell purification: a critical juncture for laboratory research and translational science. *Cells Tissues Organs* 2012; 195(1-2):26-40. doi: R01 HL083895-0510.1159/000331390.
56. Takahashi N., Cummins D., Caprioli J. Rat retinal ganglion cells in culture. *Exp Eye Res* 1991; 53(5):565-572.
57. Romano C., Hicks D. Adult retinal neuronal cell culture. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26(4):379-397. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.03.001.
58. Kumar N., Borth N. Flow-cytometry and cell sorting: an efficient approach to investigate productivity and cell physiology in mammalian cell factories. *Methods* 2012; 56(3):366-374. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.03.004.
59. Fang J.H., Wang X.H., Xu Z.R., Jiang F.G. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine against glutamate-induced retinal ganglion cells damage. *BMC Neurosci* 2010; 11:31. doi: 10.1186/1471-2202-11-31.
60. Li J.B., Lu Z.G., Xu L., Wang Q., Zhang Z.H., Fang J.H. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine in a rat model of pressure-induced retinal ischemia. *Cell Biochem Biophys* 2014; 68(2):275-282. doi: 10.1007/s12013-013-9707-4.
61. Mayama C. Calcium channels and their blockers in intraocular pressure and glaucoma. *Eur J Pharmacol* 2014; 739:96-105. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.073.
62. Oz M., Lorke D.E., Yang K.H., Petroianu G. On the interaction of beta-amyloid peptides and alpha7-nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2013; 10(6):618-630.
63. Wehrwein E., Thompson S.A., Coulibaly S.F., Linn D.M., Linn C.L. Acetylcholine protection of adult pig retinal ganglion cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(5):1531-1543.
64. Thompson S.A., Smith O., Linn D.M., Linn C.L. Acetylcholine neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity in adult pig retinal ganglion cells is partially mediated through alpha4 nAChRs. *Exp Eye Res* 2006; 83(5):1135-1145. doi: 10.1016/j.exer.2006.05.022.
65. Iwamoto K., Mata D., Linn D.M., Linn C.L. Neuroprotection of rat retinal ganglion cells mediated through alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* 2013; 237:184-198. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.02.003.
66. Roberti G., Tanga L., Michelessi M., Quaranta L., Parisi V., Manni G., et al. Cytidine 5'-diphosphocholine (citicoline) in glaucoma: rationale of its use, current evidence and future perspectives. *Int J Mol Sci* 2015; 16(12):28401-28417. doi: 10.3390/ijms161226099.
67. Doozandeh A., Yazdani S. Neuroprotection in Glaucoma. *J Ophthalmic Vis Res* 2016; 11(2):209-220. doi: 10.4103/2008-322X.183923.
68. Liu Y., Tao L., Fu X., Zhao Y., Xu X. BDNF protects retinal neurons from hyperglycemia through the TrkB/ERK/MAPK pathway. *Mol Med Rep* 2013; 7(6):1773-1778. doi: 10.3892/mmr.2013.1433.
69. Kalbermatten D.F., Schaakxs D., Kingham P.J., Wiberg M. Neurotrophic activity of human adipose stem cells isolated from deep and superficial layers of abdominal fat. *Cell Tissue Res* 2011; 344(2):251-260. doi: 10.1007/s00441-011-1142-5.
70. Martens W., Sanen K., Georgiou M., Struys T., Bronckaers A., Ameloot M. et al. Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. *FASEB J* 2014; 28(4):1634-1643. doi: 10.1096/fj.13-243980.
71. Mead B., Logan A., Berry M., Leadbeater W., Scheven B.A. Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2014; 9(10):e109305. doi: 10.1371/journal.pone.0109305.
72. Oner A., Gonen Z.B., Sinim N., Cetin M., Ozkul Y. Subretinal adipose tissue-derived mesenchymal stem cell implantation in advanced stage retinitis pigmentosa: a phase I clinical safety study. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7(1):178. doi: 10.1186/s13287-016-0432-y.
73. Prokosch V., Panagis L., Volk G.F., Dermon C., Thanos S. Alpha2-adrenergic receptors and their core involvement in the process of axonal growth in retinal explants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(12):6688-6699. doi: 10.1167/iovs.09-4835.
74. Kalapesi F.B., Coroneo M.T., Hill M.A. Human ganglion cells express the alpha-2 adrenergic receptor: relevance to neuroprotection. *Br J Ophthalmol* 2005; 89(6):758-763. doi: 10.1136/bjo.2004.053025.
75. Dong C.J., Guo Y., Agey P., Wheeler L., Hare W.A. Alpha2-adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(10):4515-4522. doi: 10.1167/iovs.08-2078.
76. de Lima S., Koriyama Y., Kurimoto T., Oliveira J.T., Yin Y., Li Y., et al. Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(23):9149-9154. doi: 10.1073/pnas.1119449109.
77. Kuno N., Fujii S. Biodegradable intraocular therapies for retinal disorders: progress to date. *Drugs Aging* 2010; 27(2):117-134. doi: 10.2165/11530970-000000000-00000.
78. Emerich D.F., Thanos C.G. NT-501: an ophthalmic implant of polymer-encapsulated ciliary neurotrophic factor-producing cells. *Curr Opin Mol Ther* 2008; 10(5):506-515.
79. Cho J.H., Mao C.A., Klein W.H. Adult mice transplanted with embryonic retinal progenitor cells: new approach for repairing damaged optic nerves. *Mol Vis* 2012; 18:2658-2672.
80. Harper M.M., Grozdanic S.D., Blits B., Kuehn M.H., Zamzow D., Buss J.E. et al. Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensive rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(7):4506-4515. doi: 10.1167/iovs.11-7346.

Поступила 08.02.2017