doi: 10.17116/oftalma2017133142-48

Влияние рекомбинантного активатора плазминогена урокиназного типа на клеточную культуру пигментного эпителия сетчатки человека

Э.В. БОЙКО[1, 3], Д.С. МАЛЬЦЕВ[1], В.О. ПОЛЯКОВА[2]

[1]Кафедра офтальмологии ФГБУ ВПО МО РФ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», ул. Клиническая, 5, Санкт-Петербург, 194044, Российская Федерация; [2]Отделение патоморфологии ФГБНУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта», Менделеевская линия, 3, Санкт-Петербург, 199034, Российская Федерация; [3]ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Санкт-Петербургский филиал, ул. Ярослава Гашека, 21, Санкт-Петербург, 192283, Российская Федерация

Цель — определить влияние активатора плазминогена урокиназного типа (АПУ) на культуру клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) человека. **Материал и методы.** Токсичность АПУ в концентрации 50 ЕД/мл была исследована с помощью теста исключения трипанового синего. Влияние АПУ на миграционную активность оценивали в тестах заживления раны монослоя и миграции в камере Бойдена. Кроме того, было изучено влияние АПУ на морфологию клеток, устойчивость к трипсину и экспрессию маркера клеточной пролиферации Ki67. **Результаты.** Тест исключения трипанового синего не выявил цитотоксических эффектов АПУ в отношении ПЭС. АПУ в концентрации 50 ЕД/мл вызывал появление клеточных скоплений, увеличение количества веретеновидных клеток (в контроле и в присутствии 50 ЕД/мл АПУ соответственно 6,4±2,4 и 67,3±3,2 кл/поле, p<0,001) и статистически значимое увеличение миграционной способности в камере Бойдена (в 1,75 раза, p=0,012). Статистически значимое (p<0,05) дозозависимое увеличение скорости заживления раны монослоя и количества Ki67-позитивных клеток было выявлено во всех опытных образцах (от 2,5 до 50 ЕД/мл). Кроме того, под действием АПУ наблюдали уменьшение устойчивости клеток ПЭС к трипсину (количество устойчивых клеток в контроле и в присутствии 50 ЕД/мл АПУ соответственно 5,2±1,7 и 0,46±0,32 кл/поле, p<0,001). **Заключение.** АПУ не оказывает цитотоксические эффекты на ПЭС в концентрации до 50 ЕД/мл. При этом эффекты АПУ в отношении ПЭС сводятся к стимуляции эпителиально-мезенхимального перехода, миграционной активности, клеточной пролиферации и межклеточного взаимодействия. При этом изменение миграционной активности и пролиферации имеет дозозависимый характер.

Ключевые слова: *пигментный эпителий сетчатки, активатор плазминогена урокиназного типа, цитотоксичность, клеточная миграция, пролиферация.*

Effects of urokinase plasminogen activator on cultured human retinal epithelial cells

E.V. BOYKO[1, 3], D.S. MAL'TSEV[1], V.O. POLYAKOVA[2]

[1]Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Ministry of Defense of the Russian Federation (Department of Ophthalmology), 5 Klinicheskaya St., Saint-Petersburg, Russian Federation, 194044; [2]D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynaecology (Pathomorphology Department), 3 Mendeleevskaya liniya, Saint-Petersburg, Russian Federation 199034; [3]Saint-Petersburg branch of the Academician S.N. Fyodorov IRTC «Eye Microsurgery», 21 Yaroslava Gasheka St., Saint-Petersburg, Russian Federation, 192283

Aim — to study the effects of urokinase plasminogen activator (UPA) on the human retinal pigment epithelium (hRPE) cell culture. **Material and methods.** The toxicity of 50 U/ml UPA was studied with the trypan blue exclusion test. Cell migration was assessed by the wound healing and modified Boyden chamber assays. Additionally, cell morphology, trypsin resistance, and Ki67 expression were investigated. **Results.** Trypan exclusion test did not reveal any cytotoxicity of 50 U/ml UPA against hRPE cells. The agent appeared able to induce cellular cluster formation and increase the number of spindle-shaped cells (6.4±2.4 cells/field and 67.3±3.2 cells/field in the controls and in the presence of 50 U/ml UPA, respectively, p<0.001). Cell migration in the Boyden chamber also showed a statistically significant increase (1.75-fold, p=0.012). Monolayer wounds were found to heal at an accelerated rate (p<0.05). This effect was dose-dependent, just like the increase in Ki67-positive cells (from 2.5 to 50 U/ml). Moreover, there was a reduction in trypsin resistance of the hRPE cells (the number of resistant cells in the control and 50 U/ml UPA cultures was 5.2±1.7 cells/field and 0.46±0.32 cells/field, respectively, p<0.001). **Conclusion.** UPA, at concentrations of 50 U/ml or less, demonstrates no cytotoxicity against the hRPE cells. The effects of UPA on hRPE include stimulation of epithelial-mesenchymal transition, migration, proliferation, and intercellular interaction. At that, changes in migratory and proliferative activity are dose-dependent.

Keywords: *retinal pigment epithelium, urokinase plasminogen activator, cytotoxicity, cell migration, proliferation.*

Плазмин — протеаза широкого спектра действия, которая разрушает фибрин и большинство субстратов внеклеточного матрикса (ВКМ), включая фибронектин и ламинин. Активность плазмина определяется действием нескольких регуляторных механизмов, но ключевое значение имеет активация специфическими протеазами — активаторами плазминогена. Активаторы плазминогена — сериновые

© Коллектив авторов, 2017

Для корреспонденции:
Мальцев Дмитрий Сергеевич — канд. мед. наук, врач-офтальмолог кафедры офтальмологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова
e-mail:glaz.med@yandex.ru

протеазы, конвертирующие плазминоген в плазмин и таким образом обеспечивающие тромболизис. Группа активаторов плазминогена включает в себя несколько разновидностей, в том числе активаторы тканевого и урокиназного (АПУ) типа [1].

И плазмин, и его активаторы нашли свое применение в офтальмологии, однако в связи со сложностью дозирования и рядом побочных эффектов применения плазмина именно его активаторы приобрели большее значение [2].

АПУ используется как катализатор фибринолиза, в первую очередь при гемофтальме [3] и свежих окклюзиях сосудов сетчатки [4], а также субретинальных кровоизлияниях [5]. Но в последнее время он также рассматривается как средство фармакологического витреолизиса [6]. Фармакологический витреолизис представляет собой малоинвазивную процедуру, позволяющую снизить патологическую роль стекловидного тела в различных заболеваниях заднего сегмента глаза. Фермент, инъецированный в стекловидную камеру глаза, осуществляет деструкцию ВКМ стекловидного тела, наиболее важным последствием чего является самопроизвольное отделение стекловидного тела от сетчатки (задняя отслойка стекловидного тела). Результатом витреолизиса, таким образом, становится устранение тракционного воздействия стекловидного тела на сетчатку, которое играет важную роль для ряда патологических состояний. Кроме того, с учетом расширения показаний к фармакологической коррекции состояния стекловидного тела применение витреолитиков, в том числе АПУ, вероятно, будет расширяться [7].

В норме АПУ достаточно широко распространен в тканях заднего сегмента глаза и обнаружен в зрительном нерве, склере, фибробластах сосудистой оболочки, сосудах, стекловидном теле, внутренних слоях нейроэпителия и пигментном эпителии сетчатки (ПЭС) [8]. Однако, являясь катализатором ферментативной активности, АПУ также выполняет функции сигнальной молекулы. Активность АПУ и экспрессия его рецептора (CD87) коррелируют с интенсивностью протеолиза ВКМ, клеточной адгезией и подвижностью, а также инвазией клеток в ВКМ [9]. В органе зрения рецепторы АПУ представлены, главным образом, в клетках ПЭС и патологических образованиях (субретинальных неоваскулярных мембранах, мембранах при пролиферативной витреоретинопатии) [10]. Таким образом, ПЭС, являясь жизненно важным для поддержания структуры и функции нейроэпителия, в то же время чувствителен к АПУ. Поэтому при расширении показаний к применению АПУ пренебречь его эффектами в отношении ПЭС нельзя, в то время как на данный момент они недостаточно изучены. В связи с этим целью исследования было определение эффектов АПУ в отношении культуры клеток ПЭС.

Материал и методы

Культура пигментного эпителия сетчатки. Были получены 6 донорских глазных яблок после изъятия роговицы для трансплантации. Время после гибели доноров варьировало от 16 до 25 ч, возраст доноров составил от 54 до 72 лет. Донорский материал был тестирован на отсутствие вирусов гепатита С и В, ВИЧ и возбудителя сифилиса. После удаления внешних тканей (жировая клетчатка и фрагменты глазодвигательных мышц) глазные яблоки дезинфицировали в 70% растворе этанола и споласкивали в стерильном физиологическом растворе, после чего удаляли передний сегмент, включая зону цилиарного тела. Из сформированного глазного бокала удаляли стекловидное тело и сетчатку, после чего глазной бокал заполняли раствором коллагеназы 1 мг/мл («Биолот», Санкт-Петрбург, Россия). Ферментацию проводили в течение 40 мин при 37 °С и 5% CO_2. Отделившиеся клетки ПЭС собирали в среду DMEM:F12 («Биолот») с 10% сыворотки крови крупного рогатого скота (СКРС) («Биолот») и центрифугировали при 300 g в течение 3 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM:F12 с 10% СКРС и засевали в культуральные флаконы 25 $см^2$.

Клетки ПЭС пассировали при достижении 70—80% конфлюентности монослоя. В экспериментах использовали клетки 4-го и 5-го пассажей. Чистота клеточной линии была тестирована окрашиванием на цитокератины 8, 18 («Thermo Scientific», Rockford, IL, США).

Все эксперименты с влиянием АПУ («Гемаза», Техноген, Москва, Россия) проводили в среде с 1% СКРС. Контрольные образцы культивировали в идентичных условиях без АПУ.

Оценка токсичности. Токсичность оценивали с помощью теста исключения трипанового синего. После экспозиции монослоя клеток ПЭС в течение 24 ч в среде с 1% СКРС и 50 ЕД/мл АПУ клетки были суспендированы трипсинизацей в течение 4 мин. Трипсин был нейтрализован добавлением 100 мкл свежей культуральной среды с 20% СКРС. Раствор трипанового синего 0,4% («Биолот») был добавлен в соотношении 1:1 (100 мкл), и суспензия мягко пипетирована. Клетки подсчитывали в камере Горяева, вычисляя долю окрашенных (нежизнеспособных) клеток.

Оценка морфологии. Монослой клеток ПЭС 5-го пассажа был трипсинизирован и ресуспендирован в среде с 1% СКРС. Суспензию вносили в лунки 48-луночного планшета по $5 \cdot 10^3$ клеток в лунку, одновременно в опытные лунки вносили АПУ до концентрации 50 ЕД /мл. Морфологию клеток оценивали в фазово-контрастном инвертированном микроскопе при увеличении 200 каждые 12 ч.

Оценка миграционной способности. Миграционную активность изучали с помощью модифициро-

ванного протокола камеры Байдена с использованием планшетных вставок с диаметром пор 8 мкм («Thermo Scientific»). В лунки 24-луночного планшета было внесено по 250 мкл среды с 5% СКРС, в неконтрольные лунки был дополнительно внесен АПУ до концентрации 50 ЕД/мл. Монослой клеток ПЭС 4-го пассажа был трипсинизирован и ресуспендирован в среде с 1% СКРС и внесен в планшетные вставки по $5 \cdot 10^3$ клеток в лунку в 250 мкл среды. В неконтрольных лунках в планшетные вставки был добавлен АПУ до концентрации 50 ЕД/мл. Миграцию оценивали на сроках 6 и 24 ч. Для этого из вставок удаляли среду и извлекали из планшетов. После 2-кратного споласкивания в растворе Хэнкса и фиксации в 70% растворе этанола внутреннюю поверхность проницаемой мембраны вставок механически очищали от оставшихся клеток. Мигрировавшие клетки, фиксированные на нижней поверхности мембраны, окрашивали гематоксилином. Количество мигрировавших клеток оценивали в фазово-контрастном инвертированном микроскопе при увеличении 200. Тест был повторен дважды в тройных сериях.

Оценка заживления раны монослоя. Суспензию клеток ПЭС 4-го пассажа вносили в лунки 48-луночного планшета по $5 \cdot 10^3$ клеток в лунку и инкубировали в среде с 10% СКРС до формирования монослоя. Рану монослоя шириной около 1000 мкм наносили наконечником стерильной пипетки. После нанесения раны культуральную среду удаляли, а лунки однократно промывали раствором Хэнкса. Затем в лунки вносили свежую культуральную среду с 1% СКРС. Скорость закрытия раны определяли методом фазово-контрастной микроскопии, оценивая культуру каждые 12 ч, в группах образцов после внесения АПУ до концентраций 5, 10, 25, 50 ЕД/мл и контрольных образцах без АПУ. Результат выражали в среднем расстоянии между краями раны. Каждая концентрация была исследована повторно 6 раз.

Устойчивость к трипсину. Монослой клеток ПЭС 5-го пассажа был трипсинизирован и ресуспендирован в среде с 1% СКРС. Суспензию вносили в лунки 48-луночного планшета по $5 \cdot 10^3$ клеток в лунку, одновременно в неконтрольные лунки вносили АПУ до концентрации 50 ЕД/мл. После инкубации в течение 72 ч культуру обрабатывали раствором трипсина (0,125%)-ЭДТА в течение 2 мин. Затем действие фермента нейтрализовали добавлением 20 мкл СКРС, а состояние монослоя оценивали методом фазово-контрастной микроскопии. Отделившиеся клетки аккуратно удаляли, а оставшиеся прикрепленными фиксировали 70% раствором этанола. Оставшиеся клетки окрашивали гематоксилином и подсчитывали, определяя увеличение количества клеток, устойчивых к трипсину, по сравнению с контролем.

Иммуноцитохимия. Суспензию клеток ПЭС 4-го пассажа вносили в лунки 24-луночного планшета с покровными стеклами по 10^4 клеток в лунку и инкубировали в среде с 10% СКРС в течение 48 ч, после чего производили смену среды на содержащую 1% СКРС, а в неконтрольные лунки вносили АПУ в концентрациях 5, 10, 25 и 50 ЕД/мл. После инкубации в течение 24 ч, среду удаляли, а лунки однократно промывали раствором Хэнкса и фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 15 мин. Затем лунки последовательно обрабатывали растворами Тритона X (0,01%) и перекиси водорода (3%) в течение 15 мин каждым. После этого лунки последовательно инкубировали при комнатной температуре с первичными антителами к белку Ki67 (DAKO, Santa Barbara, США) 1 ч и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, 30 мин (DAKO). В качестве хромогена использовали диаминобензидин (DAKO). После каждой смены реагентов выполняли 3-кратное промывание фосфатно-солевым буферным раствором по 5 мин каждое. Клетки докрашивали гематоксилином, после чего окрашенные покровные стекла закрепляли на предметных и проводили микроскопию. Количественную оценку интенсивности окраски хромогеном определяли с использованием программного обеспечения.

Статистика. Значения оцениваемых параметров выражали как среднее со стандартным отклонением ($M \pm м$). Значимость различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), различия, находящиеся в пределах уровня значимости меньше 0,05, считали статистически достоверными.

Результаты

Оценка токсичности АПУ. Тест исключения трипанового синего не выявил цитотоксических эффектов АПУ в отношении ПЭС. В максимальной исследованной концентрации 50 ЕД/мл АПУ после инкубации в течение 24 ч количество окрашивающихся после трипсинизации клеток не отличалось от такового в контроле (0,23±0,17 и 0,19±0,11% соответственно, p=0,38).

Оценка влияния на морфологию клеток. Под действием АПУ в концентрации 50 ЕД/мл в культуре увеличивалось количество клеток с выраженным фибробластоподобным фенотипом (веретеновидные клетки). В присутствии 50 ЕД/мл АПУ и в контроле оно составило 67,3±3,2 и 6,4±2,4 кл/поле соответственно (p<0,001). В контрольных образцах клетки равномерно распределялись по культуральной поверхности, в то время как в неконтрольных образцах увеличивалась способность клеток к формированию скоплений **(рис. 1)**. При этом клетки распределялись менее равномерно по сравнению с

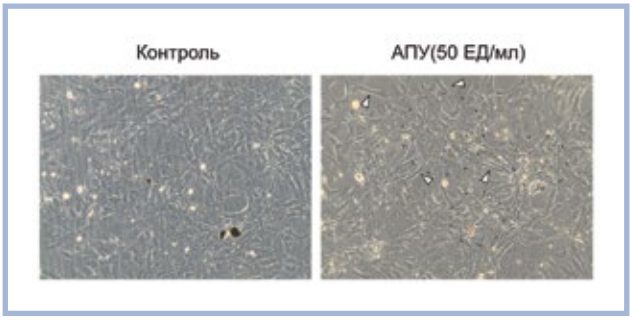

Рис. 1. **Изменение морфологии клеток ПЭС в культуре под действием АПУ.**

Появление клеточных скоплений (пунктирные линии) и увеличение количества веретеновидных клеток (указано стрелками) под действием АПУ. Фазовый контраст. Ув. 200.

монослоем контрольной культуры (количество клеток между скоплениями было меньше, чем на аналогичном участке контрольной культуры).

Оценка миграционной способности. Несмотря на отсутствие стимулирующего эффекта 50 ЕД/мл АПУ в отношении миграционной активности ПЭС в срок до 6 ч, через 24 ч культивации культура в присутствии ПЭС показала статистически значимое (p=0,012) увеличение миграционной способности в 1,75 раза **(рис. 2)**.

Оценка заживления раны монослоя. Статистически значимое увеличение скорости заживления раны монослоя было выявлено во всех неконтрольных образцах (от 2,5 до 50 ЕД/мл). При этом различия имели дозозависимый характер таким образом, что через 28 ч после нанесения раны в культуре с 50 ЕД/мл АПУ наблюдали практически полное закрытие раны монослоя **(рис. 3)**.

Тест устойчивости к трипсину. Тест продемонстрировал уменьшение количества клеток, прикрепленных к субстрату, после действия трипсина (5,2±1,7 кл/поле в контроле и 0,46±0,32 кл/поле при действии АПУ в дозе 50 ЕД/мл, p<0,001). Кроме того, тест выявил склонность культуры к формированию клеточных кластеров, наиболее вероятно, соответствующих клеточным скоплениям, при исследовании клеточной морфологии **(рис. 4)**. Эти результаты могут указывать на снижение устойчивости клеток к трипсину под действием АПУ. Однако более вероятно, что клетки, объединенные в кластер, более склонны к отделению от субстрата единым пластом, не оставляя отдельных клеток на культуральной поверхности, что говорит об усилении межклеточных взаимодействий.

Иммуноцитохимия. Исследование экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67 показало дозозависимое увеличение пролиферативной активности клеток ПЭС под действием АПУ. Количество Ki67-позитивных клеток статистически значимо (p<0,01) увеличивалось с 44,1±8,3 до 61,0±5,8% при повышении концентрации АПУ с 2,5 до 25 ЕД/мл соответственно и до 68,5±7,3% при концентрации АПУ 50 ЕД/мл **(рис. 5)**. Статистически значимых различий в количестве Ki67-позитивных клеток при увеличении концентрации АПУ с 2,5 до 5 ЕД/мл обнаружено не было, хотя количество этих кле-

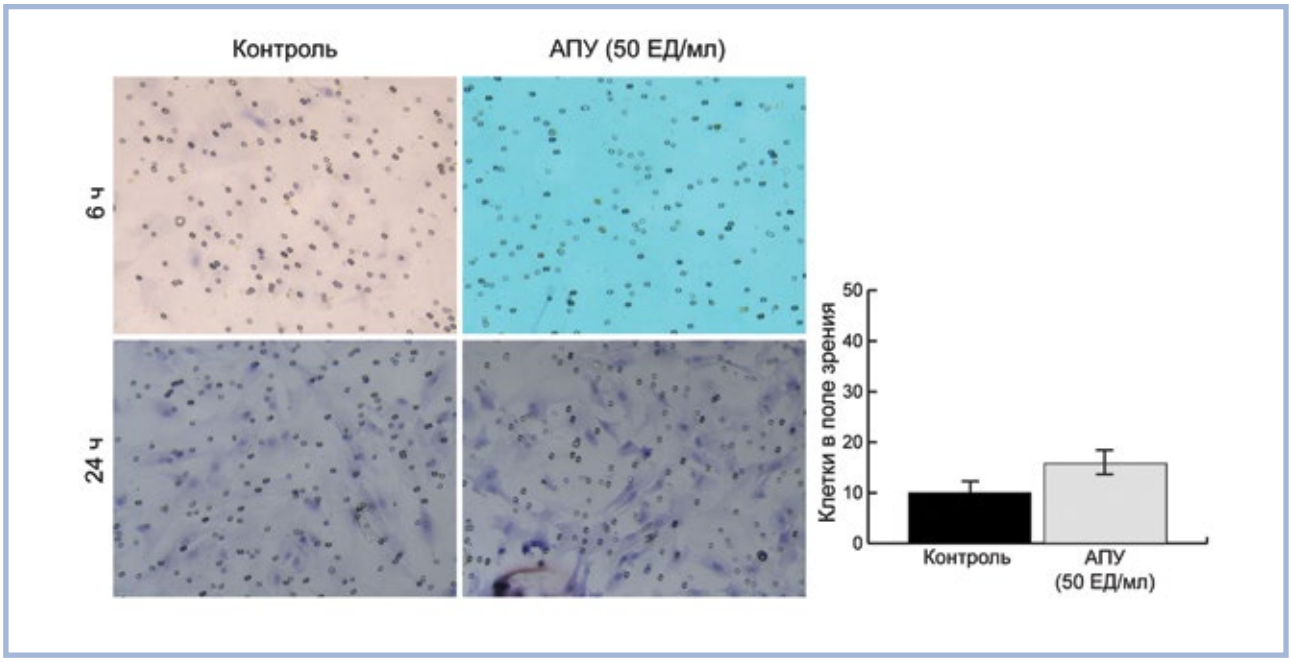

Рис. 2. **Изменение миграционной активности клеток ПЭС под действием АПУ в тесте с использованием планшетных вставок с диаметром пор 8 мкм.**

Статистически значимые различия в количестве мигрировавших клеток определяются через 24 ч инкубации в присутствии АПУ. Окраска гематоксилином Майера. Ув. 200.

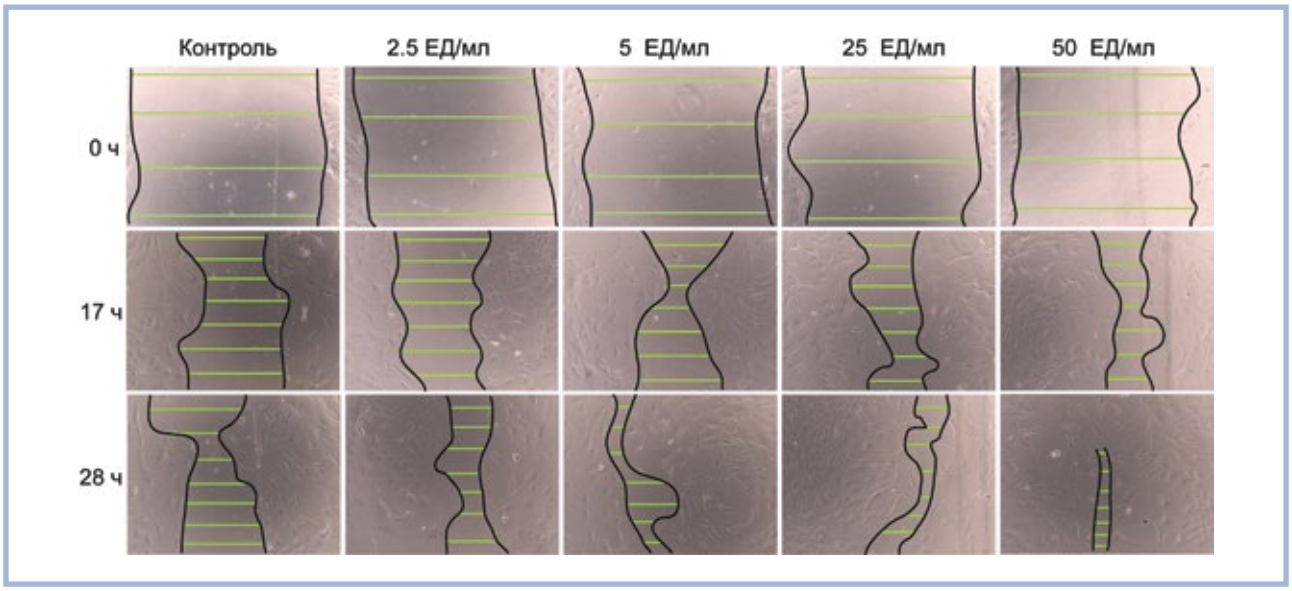

Рис. 3. **Изменение скорости заживления раны монослоя ПЭС в культуре под действием различных концентраций АПУ.**

Желтые линии отражают расстояние между границами раны, границы раны выделены черным. Определяется дозозависимость увеличения скорости заживления раны монослоя. Фазовый контраст. Ув. 200.

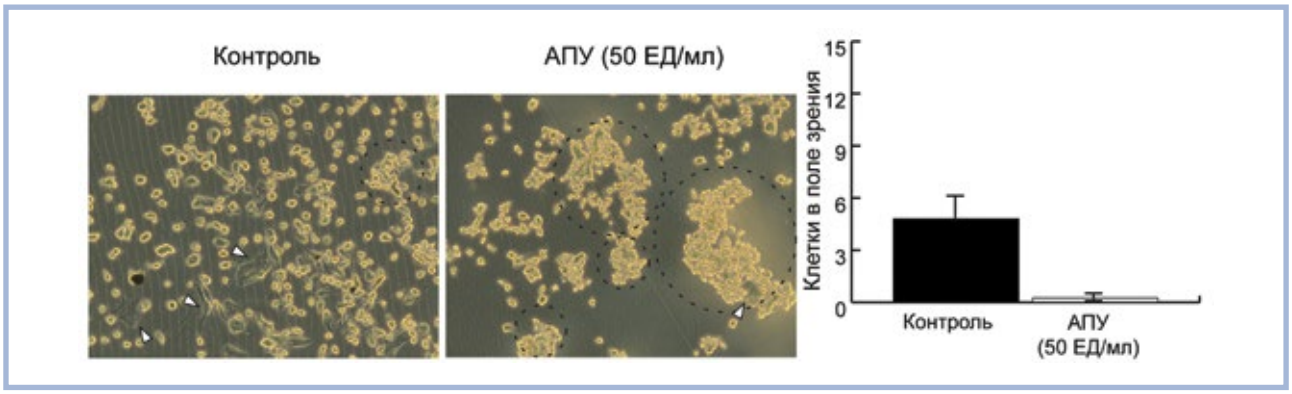

Рис. 4. **Изменение устойчивости к трипсину клеток ПЭС под действием 50 ЕД/мл АПУ.**

В контрольном образце визуализируется большое количество отдельных клеток, устойчивых к трипсину (белые стрелки). В неконтрольном образце визуализируются клеточные кластеры (пунктирные линии) и единичные устойчивые клетки. Фазовый контраст. Ув. 200.

ток в образцах с концентрацией АПУ 2,5 ЕД/мл в среднем было больше, чем в образцах с концентрацией АПУ 5 ЕД/мл.

Обсуждение

В данной работе впервые были комплексно исследованы эффекты АПУ на ПЭС *in vitro*. Результаты свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности АПУ в максимальной исследованной концентрации 50 ЕД/мл. При этом эффекты АПУ в отношении ПЭС сводятся к стимулированию эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), о чем свидетельствует изменение морфологии клеток. По результатам оценки миграционной способности и заживления раны монослоя, АПУ увеличивает миграционную активность клеток ПЭС, что, вероятнее всего, является следствием стимуляции ЭМП. Кроме того, АПУ стимулирует клеточную пролиферацию, что проявляется увеличением количества Ki67-позитивных клеток в опытных образцах культуры. Изменения миграционной активности и пролиферации под действием АПУ имеют дозозависимый характер. Кроме того, по результатам как морфологического исследования, так и теста устойчивости к трипсину, под действием максимальной исследованной концентрации АПУ клетки ПЭС приобретают тенденцию к более плотному межклеточному взаимодействию.

Эти данные соответствуют нашим собственным результатам, полученным ранее на культуре клеток ПЭС кролика. В работе было показано увеличение клеточной адгезии и степени ЭМП клеток под действием 50 ЕД/мл АПУ [11]. В других работах были показаны важная роль рецепторов АПУ в миграции клеток ПЭС в коллагеновой матрице [10] и зависи-

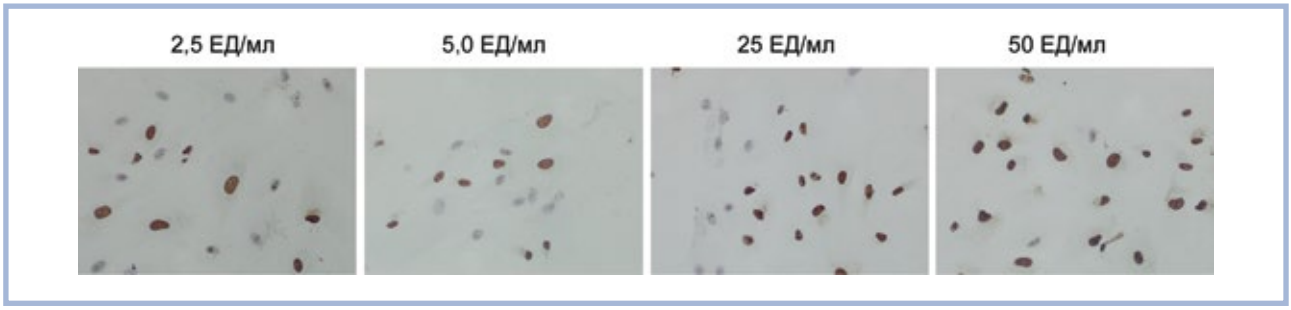

Рис. 5. **Изменение количества Ki67-позитивных клеток в культуре ПЭС под действием АПУ.**
Определяется дозозависимость увеличения количества Ki67-позитивных клеток. Иммуногистохимическое исследование. Ув. 200.

мость АПУ-опосредованных эффектов от трансформирующего фактора роста β-сигнальной молекулы, опосредующей пролиферативные процессы [12]. Однако отсутствие цитотоксичности АПУ, модуляция ЭМП, пролиферативной активности и тенденция к формированию клеточных кластеров ПЭС под действием АПУ определены нами впервые.

Рецептор-опосредованные эффекты АПУ достаточно хорошо изучены в отношении их роли в канцерогенезе. Показано, что увеличение экспрессии рецепторов АПУ стимулирует распластывание, миграцию и инвазию фибробластов и некоторых дифференцированных опухолевых клеток [13, 14]. Как регулятор пролиферативной активности АПУ активирует рецепторы фактора роста фибробластов в большинстве опухолевых клеток и стимулируют клеточное деление [15]. Тем не менее пропролиферативные эффекты АПУ являются специфичными, так как АПУ-опосредованное увеличение пролиферации наблюдается не для всех клеток. Также была показана токсичность АПУ [16], но она имела специфический (для нейронов) и непрямой (через индукцию интерлейкина-1) характер. Таким образом, в целом эффекты АПУ в отношении ПЭС, выявленные в данном исследовании, соответствуют общим биологическим свойствам АПУ. В то же время это указывает на потенциальные риски, с которыми связано применение АПУ в виде интравитреальных инъекций, а именно риски стимуляции пролиферации в стекловидном теле и нарушения эпителиального фенотипа ПЭС макулярной зоны. Условия эксперимента были приближены к клиническим. В частности, был исследован фармакопейный препарат, который применяется в клинической офтальмологии для интравитреального введения, а не лабораторный аналог, эффекты которого могут иметь отличия. Кроме того, максимальная исследованная концентрация — 50 ЕД/мл — сопоставима с создаваемой в стекловидной камере (≈100 ЕД/мл) при интравитреальном введении АПУ, поэтому результаты работы можно частично экстраполировать на *in vivo*.

Модуляция фенотипа и пролиферативной активности ПЭС имеет существенное прикладное значение. Во-первых, поддержание эпителиального фенотипа ПЭС необходимо для полноценного функционирования нейроэпителия, поэтому изменение функциональных характеристик ПЭС в проекции макулярной зоны негативно сказывается на функциональном исходе заболеваний ЗСГ. Кроме того, ЭМП и пролиферация клеток ПЭС играют важную роль в патогенезе отслойки сетчатки, так как определяют вероятность развития и выраженность наиболее тяжелого осложнения — пролиферативной витреоретинопатии [17]. Поэтому продемонстрированные в данном исследовании стимуляция миграционной и пролиферативной активности, ЭМП и усиление межклеточного взаимодействия могут негативно сказаться на течении отслойки сетчатки, как и некоторых других состояний, при которых возможно применение АПУ. Фенотип ПЭС в значительной степени определяется клеточным окружением, в особенности контактом с соседними эпителиоцитами, и именно разрушение монослоя служит основным пусковым механизмом для ЭМП [18]. Поэтому наиболее чувствительными к действию АПУ будут свободные клетки ПЭС, которые появляются в стекловидном теле при периферических разрывах сетчатки, особенно осложняющихся ее отслойкой. При этом наиболее частым прямым показанием для применения АПУ в настоящее время является гемофтальм, который обычно связан со свежим разрывом сетчатки или ее отслойкой. Таким образом, именно в этих случаях возможно применение АПУ в виде интравитреальных инъекций и его прямое воздействие на клетки ПЭС.

Кроме того, действие наиболее высоких концентраций АПУ на ПЭС возможно при субретинальном введении АПУ, что может применяться в клинической практике в случаях субретинальных геморрагий [19].

Другим наиболее вероятным показанием для интравитреального применения АПУ является витреомакулярный тракционный синдром (ВМТ) по аналогии с витреолитиком окриплазмином, недавно сертифицированным для интравитреального введения при ВМТ [20]. С учетом того, что наиболее значимым проявлением ВМТ являются макулярные разрывы, экспозиции АПУ, введеному интравитрельно, будет подвергаться функционально наиболее значимый участок ПЭС.

При таких состояниях, как диабетический макулярный отек и посттромботическая ретинопатия, фармакологическая индукция задней отслойки стекловидного тела также положительно сказывается на течении заболевания [21]. Поэтому расширение списка показаний для применения витреолитиков возможно в отношении этих заболеваний.

Существует несколько ограничений на эффекты АПУ в отношении ПЭС при интравитреальном введении. Во-первых, при интравитреальном введении концентрация лекарственного вещества в стекловидном теле может отличаться от концентрации непосредственно в оболочках заднего сегмента глаза. В связи с тем что структура внутренней пограничной мембраны сетчатки не позволяет веществам с мол. массой более 70 кДа свободно проникать в субретинальное пространство, препараты с высокой молекулярной массой оказывают меньшее действие на ПЭС. Однако АПУ имеет мол. массу 54 кДа, поэтому можно ожидать, что субретинальная концентрация после интравитреального введения будет существенной (хотя и ниже интравитреальной). Во-вторых, наиболее вероятно, что рецептор-опосредованные эффекты в полной мере будут реализовываться при непосредственной экспозиции клеток ПЭС содержимому стекловидной камеры. Это относится к макулярным разрывам сетчатки, при которых функционально наиболее важный участок монослоя ПЭС контактирует со стекловидной камерой через дефект нейроэпителия, а также к регматогенной отслойке сетчатки, что связано с выходом клеток ПЭС в стекловидное тело при этом состоянии. Поэтому не все заболевания заднего сегмента глаза, при которых возможно применение АПУ, связаны с высоким риском его влияния на ПЭС. Тем не менее отдаленные исходы применения АПУ при лечении патологии сетчатки и стекловидного тела требуют детального изучения, в особенности при состояниях, когда прямое воздействие на ПЭС наиболее вероятно (регматогенная отслойка сетчатки и макулярные разрывы).

Заключение

В данном исследовании было показано, что АПУ не оказывает токсического эффекта на ПЭС, но повышает его миграционную и пролиферативную активность, а также стимулирует ЭМП свободных клеток ПЭС.

Участие авторов.
Концепция и дизайн исследования: Д.М., В.П.
Сбор и обработка материалов: Д.М., В.П.
Написание текста: Д.М., Э.Б.
Редактирование: Э.Б.

Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Syrovets T, Lunov O, Simmet T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol*. 2012;92:509-519.
2. Bandello F, La Spina C, Iuliano L, Fogliato G, Parodi MB. Review and perspectives on pharmacological vitreolysis. *Ophthalmologica*. 2013;230:179-185.
3. Бойко Э.В., Даниличев В.Ф., Сажин Т.Г., Алиев Ш.Ф. Влияние способов введения «Гемазы» на эффективность лечения гемофтальма при диабетической ретинопатии. *Офтальмологические ведомости*. 2008;1:42-47.
4. Сосновский В.В., Сдобникова С.В. Использование тромболитических препаратов при инвазивных методах лечения окклюзий ретинальных сосудов. *Вестник офтальмологии*. 2007;5:51-54.
5. Сосновский В.В., Сдобникова С.В., Ревищин А.В., Сургуч В.К., Троицкая Н.А., Сидамонидзе А.Л., Белогуров А.А., Дельвер Е.П., Гурский Я.Г. Тактика хирургического лечения субмакулярных кровоизлияний с использованием рекомбинантной проурокиназы. *Вестник офтальмологии*. 2009;4:3-8.
6. Тахчиди Х.П., Захаров В.Д, Бадалова Л.Э., Шмыков А.В, Узунян Д.Г., Белогуров А.А., Товарова И.И., Скалбе Т.А. Применение гемазы для стимуляции задней отслойки стекловидного тела на глазах с отслойкой сетчатки. *Офтальмохирургия*. 2003;4:14-16.
7. Gandorfer A:Pharmacological vitreolysis:rationale, potential indications and promising agents. *Retina*. 2012;32:221-224.
8. Tripathi RC, Tripathi BJ, Park JK. Localization of urokinase-type plasminogen activator in human eyes:an immunocytochemical study. *Exp Eye Res*. 1990;51:5-552.
9. Reuning U, Schmitt M, Luber B, Beck V, Magdolen V. Methods to analyze the effects of the urokinase system on cancer cell adhesion, proliferation, migration, and signal transduction events. *Methods Mol Med*. 2006;120:427-440.
10. Elner SG. Human retinal pigment epithelial lysis of extracellular matrix:functional urokinase plasminogen activator receptor, collagenase, and elastase. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2002;100:273-299.
11. Бойко Э.В., Мальцев Д.С., Суетов А.А. Влияние синтетического аналога простагландина f2α и рекомбинантной проурокиназы на клеточную культуру пигментного эпителия сетчатки. *Молекулярная медицина*. 2014;5:51-55.
12. Sugioka K, Kodama A, Okada K, Iwata M, Yoshida K, Kusaka S, Matsumoto C, Kaji H, Shimomura Y. TGF-β2 promotes RPE cell invasion into a collagen gel by mediating urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression. *Exp Eye Res*. 2013;115:13-21.
13. Kjoller L, Hall A. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J Cell Biol*. 2001;152:1145-1157.
14. Madsen CD, Ferraris GM, Andolfo A, Cunningham O, Sidenius N. uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J Cell Biol*. 2007;177:927-939.
15. Festuccia C, Angelucci A, Gravina GL, Biordi L, Millimaggi D, Muzi P, Vicentini C, Bologna M. Epidermal growth factor modulates prostate cancer cell invasiveness regulating urokinase-type plasminogen activator activity. EGF-receptor inhibition may prevent tumor cell dissemination. *Thromb Haemost*. 2005;93:964-975.
16. Thornton P, Pinteaux E, Allan SM, Rothwell NJ. Matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator mediate interleukin-1-induced neurotoxicity. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37:135-142.
17. Hiscott P, Sheridan C, Magee RM, Grierson I. Matrix and the retinal pigment epithelium in proliferative retinal disease. *Prog Retinal Eye Res*. 1999;18:167-190.
18. Tamiya S, Liu LH, Kaplan HJ. Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells intiated upon loss of cell-cell contact. *Invest Ophthalm Vis Sc*. 2010;51:2755-2763.
19. Van Zeeburg EJT, Van Meurs JC. Literature review of recombinant tissue plasminogen activator used for recent-onset submacular hemorrhage displacement in age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*. 2013;229:1-14.
20. Tsui I, Pan CK, Rahimy E, Schwartz SD: Ocriplasmin for vitreoretinal diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:354979.
21. De Smet MD, Elkareem AMG, Zwinderman AH. The vitreous, the retinal interface in ocular health and disease. *Ophthalmologica*. 2013;230:165-178.

Поступила 21.12.2015