

ОФТАЛЬМОЛОГИЯ OPHTHALMOLOGY

БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОДЕЛИ КЕРАТОКОНУСА – КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ РОГОВИЧНЫХ ФИБРОЦИТОВ, ВЫРАЩЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ДЕПЛЕТИРОВАНИЯ ПО ЦИНКУ

Суббот А.М.¹,
Ефремов Ю.М.²,
Тимашев П.С.²,
Новиков И.А.¹,
Патеюк Л.С.¹,
Кобзева А.В.¹,
Аветисов С.Э.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова» (119021, г. Москва, ул. Россолимо, 11а, Россия)

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, г. Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Патеюк Людмила Сергеевна,
e-mail: sweethailtoyou@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Изучение этиопатогенеза такого заболевания роговицы, как кератоконус, существенно затруднено в связи с невозможностью исследования лежащих в его основе ультраструктурных и молекулярных изменений роговицы на пациентах *in vivo* и на животных моделях.

Цель исследования. Оценка влияния деплетирования среды ионами цинка на структуру и биомеханические свойства стромы роговицы *in vitro* на примере клеточной модели роговичных фиброцитов.

Материал и методы. В процессе настоящего экспериментального исследования были использованы клеточные модели стромы роговицы в «норме» и при кератоконусе – трёхмерные тканеинженерные конструкции на основе роговичных фибробластов, полученных из кератоцитов здоровых доноров, выращенных на стандартной и обеднённой ионами цинка питательных средах соответственно. Оценку биомеханических свойств тканеинженерных конструкций, моделирующих «здоровую» и «кератоконусную» строму роговицы, производили методом наноиндентирования при помощи атомно-силового микроскопа. Дополнительно проводили гистологическую оценку полученных клеточных пластов и иммуногистохимический анализ коллагена I типа.

Результаты. По итогам исследования пяти образцов каждой из моделей стромы роговицы было установлено статистически значимое различие биомеханических свойств: эффективный модуль Юнга «здоровой» и «кератоконусной» моделей составил 9,9 [5,4; 15,6] и 10,3 [6,1; 14,8] кПа соответственно. Толщина пластов в «здоровой» группе составила $17,67 \pm 1,32$ и $18,10 \pm 1,22$ мкм на сроке 2 и 4 недели культивирования соответственно; в «кератоконусной» группе на деплетированной по цинку среде толщина пластов составила $21,25 \pm 8,39$ и $25,55 \pm 5,67$ мкм на тех же сроках культивирования соответственно. В структуре последних превалирует экстраклеточный компонент с избыточной коллагеновой фракцией.

Заключение. Полученные по итогам экспериментальной работы данные подтверждают современную концепцию этиопатогенеза кератоконуса, согласно которой нарушения биомеханической функции роговицы при этом заболевании являются следствием минерального дисметаболизма ионов меди, железа и цинка в её соединительнотканной строме.

Ключевые слова: кератоконус, этиопатогенез, клеточные модели, цинк, халькофильные элементы, биомеханика

Для цитирования: Суббот А.М., Ефремов Ю.М., Тимашев П.С., Новиков И.А., Патеюк Л.С., Кобзева А.В., Аветисов С.Э. Биомеханические свойства модели кератоконуса – клеточной культуры роговичных фиброцитов, выращенных в условиях деплетирования по цинку. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(1): 179-188. doi: 10.29413/ABS.2025-10.1.19

Статья поступила: 27.06.2024

Статья принята: 24.01.2025

Статья опубликована: 13.03.2025

BIOMECHANICAL PROPERTIES OF KERATOCONUS MODEL – CORNEAL FIBROCYTES CELL CULTURE IN ZINC DEPLETED GROWTH MEDIUM

Subbot A.M.¹,
Efremov Yu.M.²,
Timashev P.S.²,
Novikov I.A.¹,
Pateyuk L.S.¹,
Kobzeva A.V.¹,
Avetisov S.E.^{1,2}

¹ M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases (Rossolimo str. 11A, Moscow 119021, Russian Federation)

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (Bolshaya Pirogovskaya str. 2, build. 4, Moscow 119991 Russian Federation)

Corresponding author:

Lyudmila S. Pateyuk,
e-mail: sweethailtoyou@mail.ru

ABSTRACT

Background. Etiology and pathogenesis research of such a corneal disease as keratoconus is rather difficult due to the impossibility to study the underlying ultrastructural and molecular cornea changes in vivo and in animal models.

The aim. To evaluate zinc relevance in the biomechanical properties of the corneal stroma – by means of in vitro keratoconus cell model.

Materials and methods. In this experimental study, normal and keratoconic cell models of the corneal stroma were exemplified – three-dimensional tissue-engineered structures of corneal fibrocytes obtained from healthy donors keratocytes and grown on standard and zinc-depleted nutrient media, respectively. The biomechanical properties of tissue-engineered structures modeling the normal and keratoconic corneal stroma were evaluated by means of the atomic force microscope nanoindentation. Additionally, histological assessment of the obtained cell models and immunohistochemical analysis of type I collagen were performed.

Results. According to the study of five samples of each of the corneal stroma models, a statistically significant difference in viscoplastic biomechanical properties was shown: the effective Young's modulus of the normal and keratoconic models was 9.9 [5.4; 15.6] and 10.3 [6.1; 14.8] kPa, respectively. The in "healthy" group cell cultures thickness was 17.67 ± 1.32 and 18.10 ± 1.22 microns for two and four weeks of cultivation, respectively; in the "keratoconus" group, in a zinc depleted medium, the cell cultures thickness was 21.25 ± 8.39 and 25.55 ± 5.67 microns at the same time of cultivation, respectively. The extracellular component with an excess collagen fraction prevails in the structure of the latter.

Conclusion. The data obtained confirms the modern keratoconus etiology and pathogenesis concept – the biomechanical function deterioration of the keratoconic cornea is a consequence of copper, iron and zinc mineral dysmetabolism in its stroma.

Key words: keratoconus, etiology, pathogenesis, cell models, zinc, chalcophilic elements, biomechanics

Received: 27.06.2024

Accepted: 24.01.2025

Published: 13.03.2025

For citation: Subbot A.M., Efremov Yu.M., Timashev P.S., Novikov I.A., Pateyuk L.S., Kobzeva A.V., Avetisov S.E. Biomechanical properties of keratoconus model – corneal fibrocytes cell culture in zinc depleted growth medium. *Acta biomeдика scientifica*. 2025; 10(1): 179-188. doi: 10.29413/ABS.2025-10.1.19

ОБОСНОВАНИЕ

Кератоконус (КК) – двустороннее невоспалительное заболевание роговицы дегенеративно-дистрофического характера. Клинически КК проявляется конусовидной деформацией роговицы с её выпячиванием и истончением, что симптоматически сопровождается прогрессирующим иррегулярным астигматизмом с неуклонным снижением зрения у лиц молодого трудоспособного возраста вплоть до профессиональной нетрудоспособности и инвалидизации по зрению.

Этиология и патогенез КК остаются до конца не установленными, несмотря на многочисленные исследования, проведённые с целью изучения природы его возникновения и механизмов развития. В отношении патогенеза КК достоверно известно, что в процессе развития этой кератэктазии имеет место прогрессирующее нарушение биомеханической прочности роговицы: её строма теряет свою опорную функцию, что было подтверждено как клинически, так и экспериментально. Причиной нарушения прочностных характеристик роговицы при КК можно считать прогредиентные деструктивные изменения в её строме, нарастающие по мере прогрессирования кератэктазии: снижение числа коллагеновых пластин, нарушение ориентации коллагеновых волокон, дезорганизация волокнистых структур, снижение числа внутри- и межмолекулярных связей коллагена, изменение объёма и состава межклеточного вещества [1–4].

Среди современных теорий развития КК есть представление о том, что причиной дегенеративно-дистрофических изменений в роговице является минеральный дисметаболизм с обеднением её тканей химическими элементами халькофильной группы – медью, железом и цинком. Отсутствие ионов халькофильных металлов в роговице приводит к аномальной активности металлозависимых энзимов, в норме обеспечивающих метаболизм соединительнотканых структур её стромы. Известно, что ионы цинка являются кофакторами матриксных металлопротеиназ, в том числе коллагеназ, и супероксиддисмутаза. В отсутствие ионов цинка в тканях происходит нарушение процессов распада коллагена, приводящее к фиброзным изменениям, и нарушение антиоксидантной защиты, приводящее к оксидативному стрессу. Ферментативная недостаточность в тканях роговицы имеет своим следствием каскад деструктивных изменений, результатом которых и является биомеханическая несостоятельность роговицы [5].

Изучение патогенетических механизмов развития КК осложняет тот факт, что воспроизведение его на животных моделях невозможно, а исследования *in vivo* ограничены. В связи с этим особую актуальность в последнее время приобретают клеточные модели тканей роговицы. На таких *in vitro* моделях в 2D- и 3D-формате исследуются в основном молекулярно-генетические аспекты, связанные с КК.

Нашей исследовательской группой также была предложена клеточная модель для изучения патогенеза КК с прицелом в первую очередь на возможность оценки биомеханических свойств полученной конструкции [6].

Одним из мощных инструментов для прецизионной оценки механических характеристик микрообъектов является атомно-силовая микроскопия, которая в последнее время всё больше и чаще используется для изучения различных биологических объектов, в том числе тканей и клеток. Коммерческие системы в настоящее время специально адаптированы для работы с нативным биологическим материалом в физиологически адекватных условиях (жидкая среда, оптимальная температура).

Принцип методики заключается в количественной оценке деформации исследуемого образца в каждой точке его поверхности (микрокартирование). В каждой анализируемой точке исследуемого образца производится регистрация силовой кривой (кривая зависимости силы взаимодействия между зондом и образцом), позволяющей оценивать механические свойства материала. Режим микрокартирования даёт возможность получать карты распределения перечисленных выше показателей с высоким пространственным разрешением [7]. Широко используемым количественным индикатором биомеханических свойств тканей и клеток в этом случае является модуль Юнга или модуль упругости (E , Па) – физическая величина, характеризующая сопротивляемость материала упругой (остаточной) деформации (растяжению или сжатию). По сути, чем меньше модуль Юнга, тем большую деформацию (без потери внутренней структуры) способен претерпевать материал при внешних нагрузках. Однако, помимо модуля Юнга, на сопротивление деформации также влияют геометрия, плотность и внутренняя структура материала (ориентированность, связанность, внутренние напряжения). Большой модуль Юнга может соответствовать меньшей пластичности образца, то есть его большей хрупкости, однако данные параметры не всегда коррелируют. При изучении биологических объектов (для которых характерна неоднородная структура) модуль Юнга наделяют определением «кажущийся», или «эффективный» [7].

Предложенная клеточная модель и разработанный способ селективной элиминации халькофильных элементов делают возможным оценку влияния изъятия из клеточного окружения цинка на биомеханические свойства клеточной конструкции, моделирующей строму роговицы.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка влияния деплетирования среды ионами цинка на структуру и биомеханические свойства стромы роговицы *in vitro* на примере клеточной модели роговичных фибробластов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для изучения зависимости биомеханических свойств роговицы от элементного микроокружения

были использованы культуры роговичных фибробластов, выращенные в виде тканеподобных структур – трёхмерные 3D-модели стромы роговицы.

Клеточные культуры получили путём прорастивания кератоцитов из эксплантов роговицы – фрагментов периферической части кадаверных роговичных дисков, не востребованных при проведении кератопластики и подлежащих утилизации (исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013)). Клетки третьего пассажа засеивали в концентрации 300 тыс./см² на поверхность культурального пластика чашки Петри диаметром 35 мм (SPL, Корея). Клетки культивировали в течение месяца при температуре 37,0 °С во влажной атмосфере с 5,0%-м содержанием CO₂ в среде DMEM High Glucose (Gibco, США), в которую были добавлены: глютамин (Gibco, США) до 2 мМ, фетальная бычья сыворотка FBS (Sigma, США) до 10 % и аскорбиновая кислота (Sigma, США) до 50 мкг/мл; смену среды осуществляли каждые 2–3 дня.

При этом для получения клеточной модели «здоровой» стромы роговицы в ростовую среду добавляли стандартную фетальную бычью сыворотку. Для получения клеточной модели «кератоконусной» роговицы в ростовую среду добавляли обеднённую цинком сыворотку (сыворотка, прошедшая предварительную обработку катионообменной смолой с целью деплетирования среды ионами цинка до концентрации последнего не более 13 мкг/л; заверку концентрации химических элементов в полученной сыворотке производили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой по ранее описанной нами методике) [6].

Оценку биомеханических свойств «кератоконусных» и «нормальных» клеточных моделей стромы роговицы производили на трёх исследуемых и трёх контрольных образцах соответственно при помощи атомно-силового микроскопа Bioscope Resolve (Bruker, США). Механические свойства клеточных пластов измеряли методом микрокартирования поверхности в режиме Fast Force Volume в жидкостной среде; в данном режиме в каждом пикселе карты (32 × 32 точки по карте 100 × 100 мкм) происходит индентирование образца зондом с последующим расчётом локального модуля Юнга. Сканирование осуществляли с применением кантилеверов «PFQNM-LC-A-CAL», имеющих калиброванную производителем константу жёсткости порядка 0,1 Н/м и радиус закругления 70 нм. Модуль Юнга вычисляли по модели Герца [8].

После оценки биомеханических свойств клеточный пласт однократно промывали раствором Версена и отделяли от дна путём тракции. Снятый пласт фиксировали в растворе глютарового альдегида и изготавливали полутонкие срезы. Окраску проводили метиленовым синим и фуксином. Полученные срезы фотофиксировали и измеряли толщину клеточного слоя на изображениях.

Для окрашивания на коллаген I типа клетки растили на пластиковых покровных стёклах диаметром 9 мм, фиксировали холодным метанолом в течение

ночи при 4 °С. Окрашивание проводили антителами к коллагену I типа (Invitrogen, MA1-26771; Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:1000. Вторичные антитела с меткой Alexa Fluor 594 (Invitrogen, A-11032; Thermo Fisher Scientific, США) использовали в разведении 1:500. Съёмку проводили на лабораторном микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems CMS GmbH, Германия), фотосъёмку осуществляли камерой Leica DFC320 (Leica Microsystems CMS GmbH, Германия) в программе Leica Application Suite.

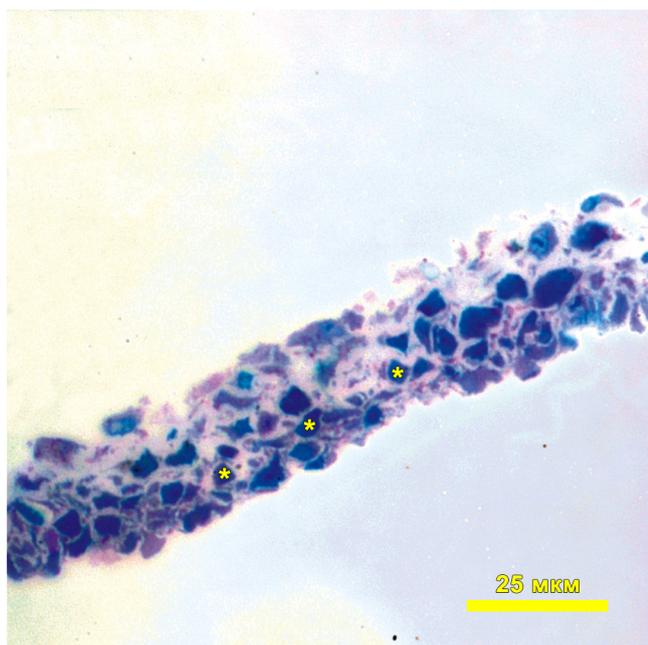
Статистическую обработку полученных данных проводили в программе GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., США). Проверку на нормальность осуществляли с помощью теста Колмогорова – Смирнова. Для сравнения групп использовали критерий Манна – Уитни. Уровень $p < 0,05$ принимали за статистически значимый. При нормальном распределении переменных в тексте приводятся средние значения и стандартные отклонения, при отличии от нормального – медианные и квартили.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Длительное культивирование кератоцитов в высокой плотности позволяло формировать равномерные клеточные пласты, представленные несколькими слоями клеток. Тканеинженерные модели «нормальной» стромы роговицы были представлены клеточными пластами толщиной $17,67 \pm 1,32$ и $18,10 \pm 1,22$ мкм на сроке 2 и 4 недели культивирования соответственно; клеточные модели «кератоконусной» роговицы, полученные на деплетированной по цинку среде, отличались большей толщиной – $21,25 \pm 8,39$ и $25,55 \pm 5,67$ мкм на тех же сроках культивирования соответственно, более крупными клеточными ядрами и выраженной долей внеклеточной фракции. Можно отметить, что по сравнению с «нормой» (рис. 1а) в структуре пластов, выращенных на обеднённой по цинку среде, превалирует экстраклеточный компонент, а ядра клеток отличаются большими размерами (рис. 1б).

Этот факт подтверждается данными иммуноцитохимического окрашивания: по сравнению с контрольными образцами (рис. 2а) сигнал от коллагеновой фракции в «кератоконусных» образцах более значительный (рис. 2б).

В ходе экспериментальной работы путём биомеханического наноиндентирования поверхности изучаемых тканеинженерных конструкций с помощью атомно-силового микроскопа удалось определить значения эффективного модуля Юнга. Результаты серий биомеханических тестов (микрокартирования) статистически значимо отличались между клеточными 3D-моделями «здоровой» и «кератоконусной» роговиц. Распределение эффективного модуля Юнга представлено на рисунке 3. Модуль упругости Юнга клеточных пластов, моделирующих КК, был статистически значимо выше по сравнению с «нормой»: 9,9 [5,4; 15,6] и 10,3 [6,1; 14,8] кПа соответственно ($p = 0,0103$).



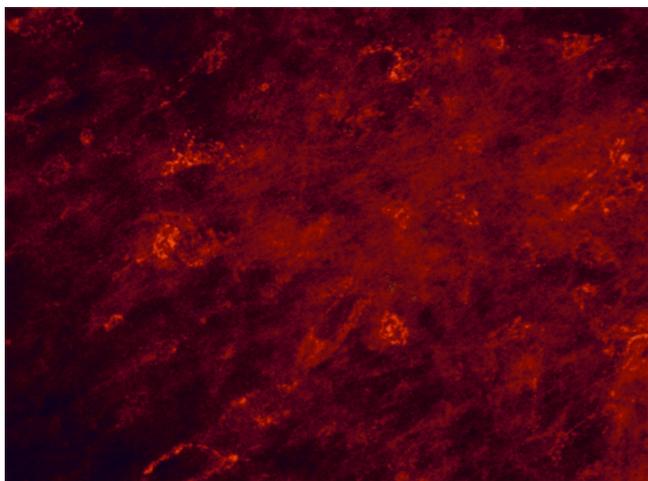
а

РИС. 1.
Срезы клеточных пластов роговичных фибробластов (световая микроскопия, окраска метиленовым синим и фуксином): **а** – культура, выращенная в стандартной среде; **б** – культура, полученная на обеднённой цинком среде; * – ядра клеток



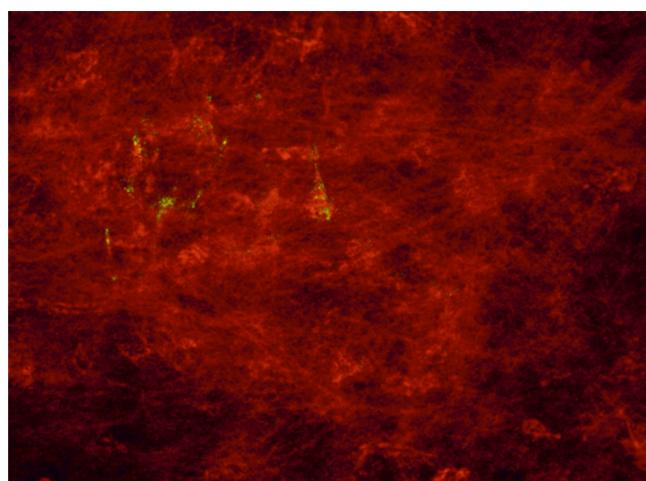
б

FIG. 1.
Sections of corneal fibroblast cell layers (light microscopy, stained with methylene blue and fuchsin): **a** – culture grown in standard medium; **b** – culture grown in zinc-depleted medium; * – cell nuclei



а

РИС. 2.
Иммунофлуоресцентная картина клеточных культур роговичных фибробластов, полученная в результате окрашивания на коллаген I типа: **а** – культура, выращенная в стандартной среде; **б** – культура, полученная на обеднённой цинком среде



б

FIG. 2.
Immunofluorescence image of corneal fibroblast cell cultures obtained by staining for type I collagen: **a** – culture grown in standard medium; **b** – culture grown in zinc-depleted medium

Полученные данные свидетельствуют в пользу повышения жёсткости тканеинженерных конструкций, выращенных в условиях дефицита ионов цинка в питательной среде. Такое повышение жёсткости

может быть связано с большей фракцией внеклеточного матрикса в такой конструкции, так как внеклеточный матрикс является более жёстким компонентом, чем клетки.

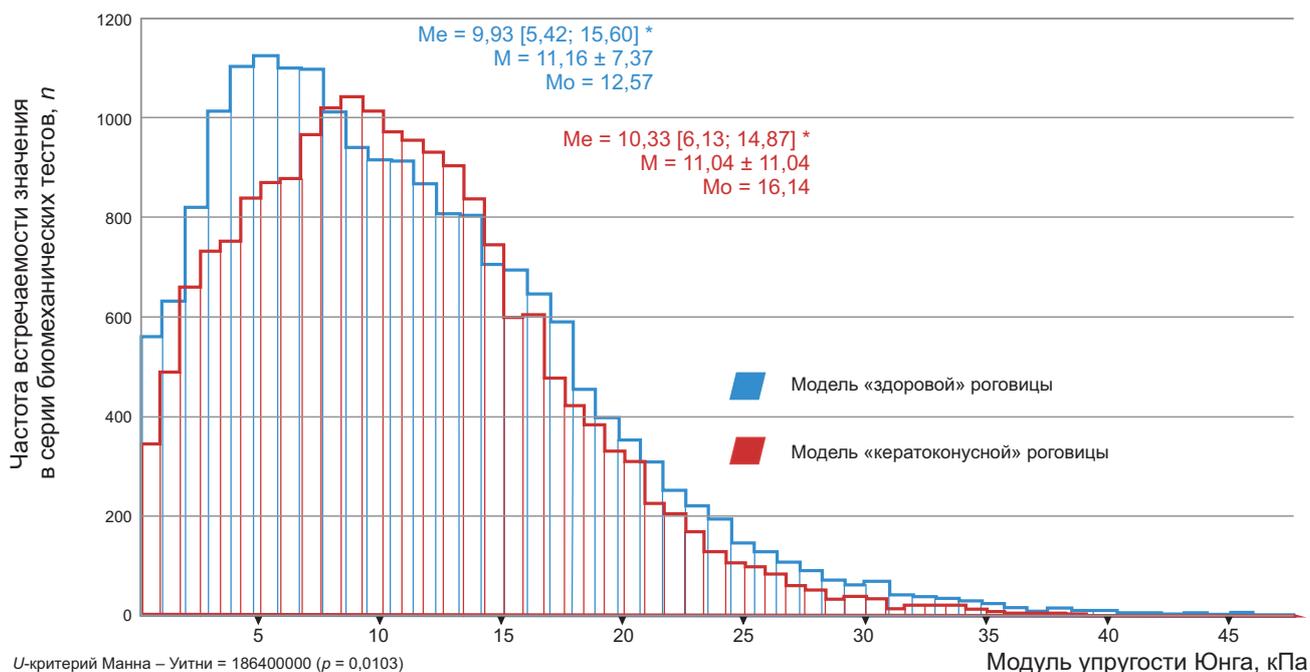


РИС. 3.

Диаграмма распределения частот встречаемости числовых значений модуля Юнга по результатам наноиндентирования методом атомно-силовой микроскопии тканеинженерных конструкций, моделирующих строму роговицы при кератоконусе и в «норме»

FIG. 3.

Frequency distribution diagram of the numerical values of Young's modulus based on the results of nanoindentation by atomic force microscopy of tissue engineered structures modeling the corneal stroma in keratoconus and in the normal conditions

ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточные технологии приобретают всё большую распространённость в медицинской сфере. Используемые в настоящее время в научных и клинических целях клеточные модели тканей глаза, в том числе роговицы, очень многообразны и варьируют от простых однослойных культур (2D-модели) до сложных многослойных трёхмерных органотипических (в том числе состоящих из нескольких типов клеток) тканеинженерных конструкций (3D-модели). Клеточные модели роговицы могут быть как воспроизводимы исключительно в лабораторных условиях по оригинальным методикам, так и представлены коммерческими вариантами серийного производства в промышленных масштабах [9–12].

Несмотря на многочисленные исследования, посвящённые изучению природы КК, лежащие в основе развития этого заболевания пусковые и патогенетические механизмы всё ещё малоизучены. Особый научно-практический интерес представляют ультраструктурные и молекулярные изменения в тканях роговицы при начальных стадиях заболевания, прижизненная высокоточная оценка которых не представляется возможной, а попытки моделирования этого вида кератэктазии на животных оказались безрезультатными. С целью исследования патогенетических механизмов развития КК наиболее актуальным представляется изучение её стромы как наиболее значимой в плане каркасной функции структуры. К настоящему моменту предложено несколько ориги-

нальных тканеспецифичных клеточных моделей, воспроизводящих в лабораторных условиях строму роговицы в «норме» и при КК. Эти клеточные модели были использованы для оценки морфологических свойств и молекулярно-генетических особенностей стромы роговицы при КК.

Серии *in vitro* экспериментов с клеточными культурами роговичных фибробластов провели R. Joseph и соавт. [13]. Разработчики ставили своей задачей оценить роль генетических и молекулярных факторов в патогенезе КК на примере 2D-моделей стромы роговицы. С этой целью исследователи в стандартных условиях культивировали роговичные фибробласты, полученные на основе кератоцитов, взятых от пациентов с КК и от условно здоровых доноров – получая *in vitro* модели «кератоконусной» и «здоровой» стромы роговицы соответственно.

Так, в 2012 г. исследователям удалось показать существенные различия в экспрессии β -актина и антигена человека R (HuR, human antigen R) между изучаемыми клеточными моделями. В культуре «кератоконусных» роговичных фибробластов выявлено нарушение (практически полное отсутствие) экспрессии β -актина и HuR по сравнению с моделью «здоровой» роговицы [13].

В 2016 г. эти же авторы предложили оригинальный способ моделирования «здоровой» стромы роговицы и стромы роговицы при КК *in vitro* с использованием клеточных культур роговичных фибробластов на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

(iPSC, induced pluripotent stem cells), полученных вирусным методом из кератоцитов здоровых лиц и пациентов с КК соответственно [14].

Клоны iPSC, полученные от «кератоконусных» и «здоровых» роговиц, были изучены по уровню экспрессии ряда генов. Из 28 665 подлежащих анализу генов была выявлена более чем двукратная разница в уровне экспрессии 4300 генов и статистически значимое отличие в экспрессии 870 генов. По сравнению с «нормальными» iPSC-клонами в «кератоконусных» iPSC-клонах было выявлено многократное снижение экспрессии рецептора фактора роста фибробластов 2 (FGF-R2, fibroblast growth factor receptor 2), что соответствует ранее полученным этими же авторами результатам, согласно которым в строме роговичных дисков «кератоконусных» пациентов наблюдается значительное снижение экспрессии FGF-R2 по сравнению со «здоровой» роговицей [14].

Полученные исследователями недифференцированные iPSC-клоны культивировали в модифицирующих условиях с целью дифференцировки плюрипотентных клеток в роговичные фибробласты. Морфологическое исследование показало, что в «кератоконусной» культуре плотность клеточных элементов была существенно ниже по сравнению с «нормой». Анализ клеточных культур показал двукратное снижение экспрессии FGF-R2 в «кератоконусной» модели по сравнению с «нормой» [14].

В ходе этой серии экспериментальных работ по изучению патогенеза КК авторы не ставили своей задачей получение многослойной тканеподобной 3D-модели с целью изучения и оценки влияния внешних экологических и средовых факторов на развитие и течение заболевания, а использовали клеточные культуры исключительно для исследований молекулярно-генетического характера [13–15].

Другие исследователи перешли от плоскостных 2D-моделей к объёмным тканеподобным структурам.

Известен способ *in vitro* моделирования стромы роговицы при КК, предложенный D. Karamichos и соавт. в 2012 году. Исследователи оценивали клеточные культуры роговичных фибробластов, полученные в стандартных условиях на основе кератоцитов, взятых от пациентов с КК и условно здоровых доноров. Авторы культивировали роговичные фибробласты в виде тканеподобных 3D-структур и оценивали морфологические свойства полученных моделей, а также анализировали уровень экспрессии специфических компонентов внеклеточного матрикса клеточных культур. Авторы сравнивали свойства полученных моделей, отличающиеся между собой исключительно генотипическими характеристиками [16].

Благодаря такому подходу авторам модели удалось установить, что, в отличие от «нормальных» клеток, роговичные фибробласты при КК продуцируют коллаген III типа, секретируют гладкомышечный актин, дают менее выраженный ответ на стимуляцию трансформирующими факторами роста бета-1 и бета-3. Такая клеточная модель позволила оценить морфологи-

ческие особенности «кератоконусной» стромы роговицы по сравнению с «нормой»: тканеподобные структуры, полученные на основе «кератоконусных» кератоцитов, отличались меньшей толщиной клеточного пласта (вплоть до 2D-монослоя вместо 3D-конструкции), а также характеризовались менее сложной (упрощённой) организацией фибриллярных компонентов и клеточных элементов в культуре (с большей анизотропией и меньшим углом ротации) [16].

Есть примеры, когда исследователи так же, как и мы, изменяли стандартные условия культивирования. Так, исследование J. Foster и соавт., проведённое в 2014 г., было направлено на изучение состояния сигнальных путей в культуре роговичных фибробластов, полученных из кератоцитов «кератоконусных» пациентов и условно здоровых лиц. Специфическими условиями культивирования роговичных фибробластов (нестандартная питательная среда без фетальной бычьей сыворотки при концентрации глюкозы 5,5 mM) авторы добивались в максимальной степени сохранения морфологического фенотипа кератоцитов. Также с целью управления интенсивностью метаболических процессов культуры растили в условиях стандартного (5,5 mM) или повышенного (25,0 mM) содержания глюкозы в питательной среде. В целом такое многоэтапное изучение молекулярных механизмов развития КК на примере клеточной модели этого заболевания позволило учёным прийти к выводам о том, что «кератоконусные» кератоциты хуже переносят «клеточный стресс» [17].

Вышеприведённые примеры клеточных моделей КК позволили *in vitro* изучить некоторые возможные патогенетические механизмы развития этого вида кератэктазии. Однако данные клеточные модели отличаются односторонним взглядом на природу возникновения и развития КК – они не принимают во внимание влияние ненаследственных факторов организма человека и окружающей среды. Вышеописанные модели не рассматривают другие (негенетические) возможные причины развития этого заболевания вопреки тому, что на сегодняшний день существует ряд теорий и гипотез о происхождении этого типа кератэктазии: экологическая, иммуноаллергическая, механическая, метаболическая (обменная), эндокринная (гормональная) и вирусная. Большинство же авторов склонны предполагать, что КК представляет собой полиэтиологичное заболевание и имеет как минимум мультифакториальную природу.

В отличие от вышеописанных клеточных моделей, при которых в одинаковых условиях культивировали клетки, полученные от здоровых доноров и от пациентов с КК, в ходе настоящего экспериментального исследования были взяты клетки только от здоровых доноров, а в задачи работы входило моделирование средовых условий. Принципиальное отличие предложенной нами клеточной модели КК заключается в том, что модификация ростовой среды в виде селективного элиминирования биологически значимого минерального элемента (цинка) позволила оценить его влияние не только на характер роста и морфологические характеристики культуры роговичных фибробластов, но и на конкрет-

ные биомеханические свойства тканеинженерной конструкции. Благодаря предложенному подходу впервые клеточные модели роговичных фибробластов были использованы для изучения зависимости биомеханических свойств стромы роговицы от элементного микроокружения и исследования этиопатогенеза КК в аспекте современной концепции его развития.

Полученные нами методом атомно-силовой микроскопии значения эффективного модуля Юнга клеточных пластов, моделирующих строму роговицы в норме и при кератоконусе, соотносятся с данными, опубликованными другими исследователями по результатам изучения биомеханических свойств различных типов нативных клеточных элементов и тканей. Так, к примеру, значения этого показателя для фиброцитов, по данным разных авторов, в зависимости от условий эксперимента варьируют от $0,6 \pm 0,1$ до 200 ± 180 кПа, а для здоровой ткани нативной роговичной стромы этот показатель измерен в диапазоне 24–39 кПа [7, 18].

Выявленные по результатам настоящего исследования статистически значимые отличия в жёсткости тканеинженерных конструкций, выращенных в стандартной и обеднённой цинком среде, говорят о существенной роли ионов этого минерального элемента в соединительнотканном метаболизме. Обращает на себя внимание кажущееся незначительным различие в числовых значениях модуля Юнга, что является достаточно типичным для биологических объектов наблюдением: параметры (константы) внутренней среды организма человека находятся в довольно жёстком диапазоне референсных значений нормы, даже незначительное изменение которых приводит к нарушению физиологических процессов и началу патологических процессов, достаточных для развития заболевания.

В условиях деплеции по цинку сформированные клеточные пласты продемонстрировали не только более высокие значения модуля Юнга, но и увеличенную толщину с превалированием экстраклеточной фракции. Казалось бы, парадоксальное увеличение толщины клеточных пластов, выращенных в условиях деплеции по цинку, так же, как и увеличение объёма коллагенового компонента в них, на самом деле отражает патологическую дисрегуляцию обмена. Такое изменение архитектоники, хотя и не свойственно для кератоконусной роговицы, отражает состояние недостаточности катаболизирующих коллаген цинк-зависимых металлопротеиназ и «выключение» диссимилирующего плеча тканевого обмена. Следует иметь в виду, что в нативной патологически изменённой роговице при КК в центральной зоне отсутствуют не только ионы цинка, но также меди и железа, обуславливающих преимущественно анаболическую часть обмена в тканях. Но на этапе создания сложной модельной системы важно провести редукцию её компонентов и оценить вклад каждого из них в полученный результат. В представленном эксперименте нам удалось воспроизвести на клеточной модели одно из «звеньев» патологического процесса – изолированно оценить роль ионов цинка. Дальнейшая экспериментальная работа будет направ-

лена на получение клеточных моделей в условиях обеднения по другим ключевым минеральным элементам. Кроме того, полученные нами данные представляют научный интерес и вне контекста этиопатогенеза КК, отражая реакцию клеточного пласта на элиминацию цинка из питательной среды.

Вкупе с результатами иммуногистохимического окрашивания, свидетельствующими о накоплении коллагена в обеднённых цинком образцах, можно предполагать, что влияние этого микроэлемента на биомеханические свойства стромы роговицы реализуется за счёт «выключения» в его отсутствие катаболизирующих коллаген цинк-зависимых металлопротеиназ, что согласуется с минеральной концепцией развития КК. Аналогичный дисметаболизм может иметь место в строме роговицы при КК, когда осаждение цинка, железа и меди в периферической зоне роговицы приводит к тотальному отсутствию ионов этих металлов в её центральной области и, соответственно, к недостаточности металлозависимых ферментов, отвечающих за катаболизм и анаболизм в соединительнотканых структурах.

Таким образом, по результатам настоящего экспериментального исследования было показано, что элиминация ионов цинка приводит к увеличению жёсткости тканеинженерной конструкции *in vitro*: изменение минерального окружения роговичных фиброцитов способно статистически значимо влиять на морфологические и биомеханические характеристики образованных ими клеточных пластов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные по итогам экспериментального исследования результаты соотносятся с «минеральной» концепцией этиопатогенеза КК, согласно которой обеднение роговицы ионами халькофильных металлов (цинком, железом и медью) приводит к нарушению функций металлозависимых ферментов, обеспечивающих в норме гомеостаз роговичной ткани.

При селективной элиминации цинка из ростовой среды происходит изменение морфологических и биомеханических свойств клеточных моделей на основе роговичных фибробластов, что подтверждает биологическое значение этого химического элемента в метаболизме и функционировании соединительнотканых структур, таких как строма роговицы.

Финансирование

Работы по измерению механических свойств клеточных пластов с помощью атомно-силового микроскопа выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 23-74-10113, <https://rscf.ru/project/23-74-10113/>).

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Аветисов С.Э., Новиков И.А., Патеюк Л.С. Кератоконус: этиологические факторы и сопутствующие проявления. *Вестник офтальмологии*. 2014; 130(4): 110-116. [Avetisov SE, Novikov IA, Pateiuk LS. Keratoconus: Etiological factors and accompanying manifestations. *Russian Annals of Ophthalmology*. 2014; 130(4): 110-116. (In Russ.)].
2. Панес М.А., Позняк С.Н. Кератоконус (обзор литературы). *Офтальмология. Восточная Европа*. 2014; 2(21): 54-64. [Panens MA, Pozniak SN. Keratoconus (a literature review). *Ophthalmology. Eastern Europe*. 2014; 2(21): 54-64. (In Russ.)].
3. Фабрикантов О.Л., Манаенкова Г.Е. Этиология, патогенез, клиника, классификация, лечение кератоконуса (обзор литературы). *Сибирский научный медицинский журнал*. 2017; 4(37): 64-71. [Fabrikantov OL, Manaenkova GY. Etiology, pathogenesis, clinical picture, classification, treatment of keratoconus (review). *Siberian Scientific Medical Journal*. 2017; 4(37): 64-71. (In Russ.)].
4. Терещенко А.В., Демьянченко С.К., Тимофеев М.А. Кератоконус (обзор). *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2020; 16(1): 293-297. [Tereshchenko AV, Demyanchenko SK, Timofeev MA. Keratoconus (review). *Saratov Journal of Medical Scientific Research*. 2020; 16(1): 293-297. (In Russ.)].
5. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Новиков И.А., Патеюк Л.С., Осипян Г.А., Кирющенкова Н.П. Перераспределение минеральных элементов в роговице при кератоконусе. *Вестник офтальмологии*. 2015; 131(6): 34-42. [Avetisov SE, Mamikonyan VR, Novikov IA, Pateiuk LS, Osipian GA, Kiriushchenkova NP. Abnormal distribution of trace elements in keratoconic corneas. *Russian Annals of Ophthalmology*. 2015; 131(6): 34-42. (In Russ.)]. doi: 10.17116/oftalma2015131634-42
6. Суббот А.М., Новиков И.А., Патеюк Л.С., Кобзева А.В., Аветисов С.Э. Клеточная модель для экспериментального изучения патогенеза кератоконуса. *Гены и клетки*. 2023; 18(1): 69-77. [Subbot AM, Novikov IA, Pateiuk LS, Kobzeva AV, Avetisov SJ. Cell model for experimental research in keratoconus pathogenesis. *Genes & Cells*. 2023; 18(1): 69-77. (In Russ.)]. doi: 10.23868/gc321383
7. Халисов М.М. *Применение атомно-силовой микроскопии для детектирования отклика нативных клеток на внешние воздействия*. СПб.; 2018. [Khalisov MM. *Application of atomic force microscopy for detection of response of native cells to external influences*. Saint Petersburg; 2018. (In Russ.)].
8. Efremov YuM, Shpichka AI, Kotova SL, Timashev PS. Viscoelastic mapping of cells based on fast force volume and PeakForce Tapping. *Soft Matter*. 2019; 15: 5455-5463. doi: 10.1039/C9SM00711C
9. Shiju TM, Carlos de Oliveira R, Wilson SE. 3D *in vitro* corneal models: A review of current technologies. *Exp Eye Res*. 2020; 200: 108213. doi: 10.1016/j.exer.2020.108213
10. Rönkkö S, Vellonen KS, Järvinen K, Toropainen E, Urtti A. Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. *Drug Deliv Transl Res*. 2016; 6(6): 660-675. doi: 10.1007/s13346-016-0330-y
11. Reichl S. Cell culture models of the human cornea – A comparative evaluation of their usefulness to determine ocular drug absorption *in vitro*. *J Pharm Pharmacol*. 2008; 60(3): 299-307. doi: 10.1211/jpp.60.3.0004
12. García-Posadas L, Diebold Y. Three-dimensional human cell culture models to study the pathophysiology of the anterior eye. *Pharmaceutics*. 2020; 12(12): 1215. doi: 10.3390/pharmaceutics12121215
13. Joseph R, Srivastava OP, Pfister RR. Downregulation of β -actin gene and human antigen R in human keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53(7): 4032-4041. doi: 10.1167/iovs.11-9062
14. Joseph R, Srivastava OP, Pfister RR. Modeling keratoconus using induced pluripotent stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57(8): 3685-3697. doi: 10.1167/iovs.16-19105
15. Joseph R, Srivastava OP, Pfister RR. Downregulation of β -actin and its regulatory gene HuR affect cell migration of human corneal fibroblasts. *Mol Vis*. 2014; 20: 593-605.
16. Karamichos D, Zareian R, Guo X, Hutcheon AEK, Ruberti JW, Zieske JD. Novel *in vitro* model for keratoconus disease. *J Funct Biomater*. 2012; 3(4): 760-775. doi: 10.3390/jfb3040760
17. Foster J, Wu WH, Scott SG, Bassi M, Mohan D, Daoud Y, et al. Transforming growth factor β and insulin signal changes in stromal fibroblasts of individual keratoconus patients. *PLoS One*. 2014; 9(9): e106556. doi: 10.1371/journal.pone.0106556
18. Last JA, Thomasy SM, Croasdale CR, Russell P, Murphy CJ. Compliance profile of the human cornea as measured by atomic force microscopy. *Micron*. 2012; 43(12): 1293-1298. doi: 10.1016/j.micron.2012.02.014

Сведения об авторах

Суббот Анастасия Михайловна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, и. о. заведующего лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова», e-mail: kletkagb@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8258-6011>

Ефремов Юрий Михайлович – кандидат биологических наук, заведующий отделом современных биоматериалов, ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: efremov_yu_m@staff.sechenov.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7040-253X>

Тимашев Пётр Сергеевич – доктор химических наук, научный руководитель научно-технологического парка биомедицины, ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: timashev_p_s@staff.sechenov.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7773-2435>

Новиков Иван Александрович – старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова», e-mail: ivan.a.novikov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4898-4662>

Патеюк Людмила Сергеевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела патологии оптических сред глаза, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова»; e-mail: sweethailtoyou@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5757-6719>

Кобзева Анна Васильевна – младший научный сотрудник отдела патологии оптических сред глаза, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова», e-mail: akobzdoc@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0771-8934>

Аветисов Сергей Эдуардович – доктор медицинских наук, научный директор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова»; заведующий кафедрой глазных болезней, ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: s.avetisov@niigb.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7115-4275>

Information about the authors

Anastasia M. Subbot – Cand. Sc. (Med.), Senior Research Officer, Acting Head of the Laboratory of Fundamental Studies in Ophthalmology, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, e-mail: kletkagb@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8258-6011>

Yuri M. Efremov – Cand. Sc. (Biol.), Head of the Department of Modern Biomaterials, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: efremov_yu_m@staff.sechenov.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7040-253X>

Petr S. Timashev – Dr. Sc. (Chem.), Scientific Director of the Technology Park of Biomedicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: timashev_p_s@staff.sechenov.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7773-2435>

Ivan A. Novikov – Senior Research Officer at the Laboratory of Fundamental Studies in Ophthalmology, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, e-mail: ivan.a.novikov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4898-4662>

Liudmila S. Pateyuk – Cand. Sc. (Med.), Senior Research Officer at the Department of Ocular Media Pathology, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, e-mail: sweethailtoyou@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5757-6719>

Anna V. Kobzeva – Junior Research Officer at the Department of Ocular Media Pathology, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, e-mail: akobzdoc@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-0771-8934>

Sergey E. Avetisov – Dr. Sc. (Med.), Scientific Director, M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases,; Head of the Department of Eye Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: s.avetisov@niigb.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7115-4275>

Вклад авторов

Суббот А.М. – дизайн исследования; сбор экспериментального материала; обзор литературы; сбор и анализ литературных источников; подготовка и написание текста статьи.

Ефремов Ю.М. – дизайн исследования; сбор экспериментального материала.

Тимашев П.С. – дизайн исследования; сбор экспериментального материала.

Новиков И.А. – дизайн исследования; сбор экспериментального материала.

Патеев Л.С. – обзор литературы; сбор и анализ литературных источников; подготовка и написание текста статьи.

Кобзева А.В. – сбор экспериментального материала; обзор литературы; сбор и анализ литературных источников; подготовка и написание текста статьи.

Аветисов С.Э. – дизайн исследования; написание текста и редактирование статьи.

Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.