

УДК 617.713-002-02:616.98:578.825]-089.843:611.018

Регенерация поверхностного эпителия роговицы после трансплантации суспензии лимбальных клеток, культивированных *in vitro*, в эксперименте, на модели частичной лимбальной недостаточности.

П.А.Бездетко, проф., д-р. мед. наук, Е. Н. Ильина, аспирант, О.В. Наумова, доц., канд. мед. наук, Ю.Е. Микулинский, канд. биол. наук, С.Г. Панибратцева, мл. науч. сотр.

Харьковский национальный медицинский университет, лаборатория клеточных биотехнологий ХМАПО, лаборатория молекулярной диагностики «Вирола» г. Харьков.

Ключевые слова: частичная лимбальная недостаточность, аутологичные клетки лимба, трансплантация.

Здоровая поверхность глаза сформирована двумя типами эпителия – роговичным и конъюнктивальным. Передний поверхностный эпителий является одной из важнейших структур обеспечивающих гомеостаз роговицы и глаза в целом. Соответственно и патологические процессы, развивающиеся при нарушении целостности и адекватности регенераторных процессов эпителия многообразны.

Наиболее частым проявлением патологии эпителиального покрова глазного яблока является кератиты, птериgium, симблефарон, эпителиальные дистрофии роговицы [11].

При длительном отсутствии эпителиального покрова в роговице развиваются метаболические нарушения, что приводит к развитию разнообразных по клиническому проявлению патологических состояний. Данные патологические изменения могут быть подразделены на две категории. Первая категория характеризуется повреждением камбиальных клеток, что может наблю-

даться при химическом или термическом ожоге легкой или средней тяжести, при синдроме Stevens-Johnson, многократных криовоздействиях на зону лимба, длительном ношении контактных линз, воздействии ультрафиолетовых лучей. Для второй категории характерно разрушение непосредственно морфологической структуры, на которой фиксированы камбиальные клетки. Данное патологическое состояние может быть обусловлено различными кератитами, хирургическими операциями, повреждающими область лимба, ожогами тяжелой и особо тяжелой степени [10, 11, 15].

Решение медико-социальных проблем, вызванных патологическими изменениями со стороны переднего отдела органа зрения, возможно за счет разработки и внедрения комплекса лечебных и реабилитационных мероприятий, основу которых представляют реконструктивные операции. В зависимости от степени выраженности патологических изменений выполняются хирургические операции, направленные на замещение утраченных камбиальных клеток, либо хирургические вмешательства создающие условия для полноценной регенерации собственных тканей. Как правило, выполняется ауто- или аллотрансплантация биологических тканей [12, 13, 14, 16].

На основании вышеизложенного, актуально изучение восстановления поверхностного эпителия роговицы (при лимбальной недостаточности) после трансплантации лимбальных клеток, в том числе, аутологичных. Это и явилось целью нашего исследования.

Проведены экспериментальные исследования по изучению характера приживления аутооттрансплантата в лимбальной области поражённого глаза после его пересадки и сроков восстановления роговичного дефекта, с разработкой нового метода фиксации аутооттрансплантата. Проведены серии исследований, анализ которых представлен отдельно в сравнительном аспекте.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование выполнялось на 28 кроликах породы «шиншилла», весом 3-5кг, содержащихся в условиях вивария ХНМУ. Всем животным была смоделирована частичная лимбальная

недостаточность без механического повреждения лимбальной зоны по Милюдину, 2006г. [6,9].

Животным экспериментальной группы (14 кроликов) аутотрансплантат пересаживался на лимбальную область повреждённого глаза с последующим покрытием аутоконъюнктивой. На повреждённом частичной лимбальной недостаточностью глазу, сразу после деэпителизации, с двух сторон перпендикулярно лимбу, на 12 часах производилась конъюнктивотомия длиной 3мм и перемещение иссечённой конъюнктивы к лимбу на эту же длину для покрытия (иммобилизации) аутотрансплантата. В месте фиксации конъюнктивы к роговице с двух сторон были наложены два узловатых шва из виргинского нейлона 10/0.

Аутотрансплантат был получен путём культивирования участка лимба, взятого из здоровых глаз кроликов (n=14). Забор клеток из области лимба был произведён из здоровых глаз кроликов экспериментальной группы по методу Tsai R. J., Chen J. K., 2000 [17]. Методики трипсинизации и культивирования выполнялись по прописям, изложенным в руководстве по методам культивирования клеток (Гринберг К.Н., Кухаренко В.И., 1998) [1,2,3,4].

Контрольную группу составили 14 кроликов, с экспериментальной моделью частичной лимбальной недостаточности, получавшие местное консервативное лечение репаратантами (1% тиотриазолин, корнерегель). Для профилактики присоединения вторичной бактериальной инфекции у всех животных использовался антибактериальный препарат флоксал.

Наблюдение за состоянием глаз животных осуществляли на 3,7,14 сутки методиками в проходящем свете (зеркальным офтальмоскопом) и биомикроскопией (метод фокального освещения) с помощью щелевой лампы (ЩЛ-2Б). Проводилась флюоресцеиновая проба. Клиническую оценку состояния глаз животных проводили по следующим признакам: степень воспалительной реакции, характеристика дефекта роговичного эпителия (площадь, глубина, локализация), степени прозрачности и васкуляризации роговицы.

Интенсивность помутнения роговицы оценивалась по 4-х балльной шкале [Куренков В.В., 1998г.]: 0 баллов - роговица прозрачна;

0.5 баллов - начальное помутнение; 1.0 балл - флер не влияет на рефракцию;

2.0 балла - помутнение изменяет преломляющую силу роговицы; 3.0 балла - вследствие флёра не определяются детали радужной оболочки; 4.0 балла - радужка не видна.

Степень неоваскуляризации оценивалась по 4-х балльной шкале [Ина-томи Т., Япония, 2006г.]:

0 - отсутствие неоваскуляризации;

1 - периферическая васкуляризация (в области лимба);

2 - пери - и околомимбальная васкуляризация; 3 - массивная васкуляризация лимба с начальной васкуляризацией всей поверхности роговицы;

4 - массивная васкуляризация всей поверхности роговицы.

По окончании срока наблюдения животных выводили из эксперимента под наркозом методом воздушной эмболии. Материал для морфологического исследования забирался на 7, 14 сутки. Основой для морфологического исследования послужили глазные яблоки животных всех групп. Гистологические и гистохимические методики выполнялись по прописям, изложенным в руководствах по гистологической технике и гистохимии [5,7].

Достоверность различий показателей между группами оценивали с использованием критерия t Стьюдента и Хи квадрат.

Результаты и их обсуждение. При культивировании обнаружена высокая пролиферативная способность эпителиоцитов лимба. До культивирования количество клеток было $23 \pm 0,6$ на мм^2 . Через 24 часа их количество удвоилось ($49 \pm 0,9$ кл./ мм^2), $p < 0,001$. Через 58,9 $\pm 1,5$ часов образовался монослой с их утроенным количеством ($71 \pm 1,0$ кл./ на мм^2), $p < 0,001$.

В послеоперационном периоде наблюдалось спокойное течение, нагноения, потери трансплантата не наблюдалось. Все прооперированные животные сохраняли свою активность и аппетит. Температура тела незначительно

($37,2\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) повышалась на протяжении первых двух суток послеоперационного периода. Основные клинические показатели в динамике представлены ниже.

Степень и сроки исчезновения перикорнеальной инъекции. На 3 сутки в обеих группах отмечалась умеренная перикорнеальная инъекция, на 7 сутки лёгкая, а в экспериментальной группе умеренная в области частично лиризованного конъюнктивального лоскута. На 14 сутки инъекция отсутствовала. Исчезновение перикорнеальной инъекции отмечено в экспериментальной группе на $6,7\pm 0,2$ сутки, в контроле на $6,8\pm 0,2$ сутки, различия не достоверны, $p>0,05$.

На 3 сутки после проведения эксперимента в области конъюнктивально-роговичных швов наблюдался выраженный отёк эпителия. Отмечалась неполная (частичная) эпителизация дефекта роговой оболочки, с неровностью её поверхности. В среднем частичная эпителизация наступила на $2,9\pm 0,1$ сутки. Аутооттрансплантат плотно прилежал под конъюнктивой. В группе контроля на 3 сутки после проведения эксперимента отмечался центрально расположенный, почти тотальный (занимающий до 70 % площади) роговичный дефект в поверхностных слоях. Имеющийся эпителиальный слой (на периферии) был тонкий с неровной поверхностью и напелзал на роговицу в виде вала с периферии. Частичная эпителизация отмечена на $6,7\pm 0,1$ сутки, различия достоверны, $p<0,001$.

Полная эпителизация наступила на $7,2\pm 0,1$ сутки, к этому времени наблюдалась полная резорбция фибриновой подложки. В группе контроля на 7 сутки поверхность роговой оболочки была неровная. Полная эпителизация наступила на $13,9\pm 0,1$ сутки, различия средних показателей двух групп достоверны, $p<0,001$.

На 14 сутки у экспериментальных кроликов глаза были спокойные, без воспалительных изменений. Наблюдалась полная эпителизация и резорбция аутографта. Макроскопически врастания конъюнктивального эпителия на поверхность роговой оболочки не было отмечено. Роговица прозрачная глад-

кая блестящая, её поверхность ровная. В группе контроля неровная поверхность роговой оболочки, конъюнктивальный паннус.

Степень прозрачности в динамике представлена на таблице 1.

Таблица 1.

Степень прозрачности роговой оболочки у животных с экспериментальной лимбальной недостаточностью после конъюнктивальной иммобилизации аутотрансплантата и в группе контроля (в баллах).

Группы наблюдения	Сроки наблюдения		
	3 сутки	7 сутки	14 сутки
Экспериментальная	0	0	0
Контрольная	0	1,0±0,1**	1,3±0,3***
Достоверность	p>0,05	p<0,01	p<0,001

Примечание: ** - достоверное различие между средними значениями экспериментальной группы животных и группы контроля на 7 сутки после деэпителизации роговицы; *** - достоверное различие между средними значениями двух групп на 14 сутки после деэпителизации роговицы.

В экспериментальной группе помутнение отсутствовало во всех сроках наблюдения.

Степень неоваскуляризации в динамике представлена на таблице 2.

Таблица 2.

Динамика неоваскуляризации роговой оболочки у животных с экспериментальной лимбальной недостаточностью после конъюнктивальной иммобилизации и в контрольной группе (в баллах).

Группы наблюдения	Сроки наблюдения		
	3 сутки	7 сутки	14 сутки

Экспериментальная	0	0	0
Контрольная	0	2,0±0,2***	2,7±0,3***
Достоверность	p>0,05	p<0,001	p<0,001

Примечание: *** - достоверное различие между средними значениями экспериментальной группы животных и группы контроля на 7 и 14 сутки после деэпителизации роговицы.

В экспериментальной группе неоваскуляризация отсутствовала в течение всего периода наблюдения.

Морфологические результаты конъюнктивальной иммобилизации: на 7 сутки микроскопически определялось утолщение зоны лимба за счет находящегося под конъюнктивальным лоскутом аутотрансплантата. Передний эпителий роговицы был неравномерной толщины – от 3-4 до 11-12 рядов в зонах пролиферации, в которых имелись базальные эпителиоциты с фигурами митоза. В вышележащих отделах крыловидные клетки несколько меньших размеров, с округлой формой ядер. В поверхностных 1-2 рядах клетки и их ядра несколько уплощались. Отдельные эпителиоциты были увеличены в объеме за счет скопления цитоплазматической жидкости, ядра их смещены на периферию. Базальная мембрана переднего эпителия интенсивно ШИК-позитивна и фуксинофильна, непрерывна, неравномерной толщины. Кератобласты лежат между умеренно фуксинофильными тонкими соединительнотканными волокнами, складывающимися в пучки, ориентированные параллельно друг другу. Среди волокон определялись немногочисленные сосуды капиллярного типа. Их стенка была представлена умеренно ШИК-позитивной базальной мембраной и лежащими на ней эндотелиоцитами с несколько набухшей эозинофильной цитоплазмой и умеренно окрашиваемым гематоксилином уплощенным ядром. Периваскулярно определялись единичные клетки лимфоидного ряда. Часть сосудов с сужением или облитерацией

просвета. Ткань трансплантата была представлена параллельно лежащими умеренно фуксинофильными тонкими волокнистыми структурами с намечающимся формированием пластинчатых структур. Между волокнами определялись немногочисленные кератобласты и умеренно ШИК-позитивное аморфное вещество

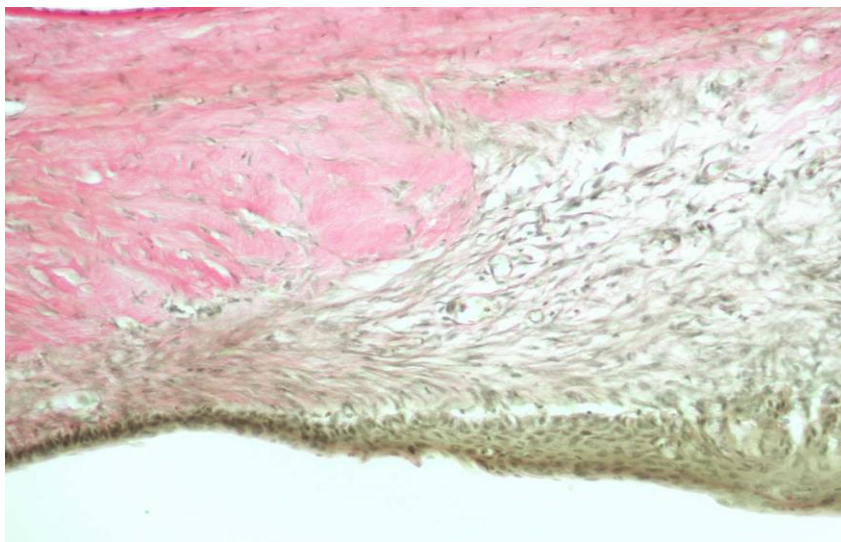


Рис.1. Аутооттрансплантат с намечающимся ламиллярным строением. В окружающей ткани пролиферация кератобластов, нежные коллагеновые волокна, формирующие пучковые структуры, новообразованные сосуды. Окраска пикрофуксином по ван Гизон. Ув. $\times 100$.

Эпителий вокруг трансплантата несколько отечен, однако воспалительной инфильтрации ткани не обнаруживается. Строение стромы, задней пограничной пластинки и заднего эпителия роговицы не отличается от таковых в предыдущих группах.

В контрольной группе животных на 7 сутки после деэпителизации (по Милюдину) морфологически было установлено нарушение дифференцировки роговичного эпителия, с наличием нехарактерных для него бокаловидных клеток. Отмечалась неровность поверхности роговицы, диффузная лимфогистиоцитарно-макрофагальная инфильтрация верхних отделов стромы, неоваскуляризация.

На 14 сутки после конъюнктивальной иммобилизации аутооттрансплантата, при микроскопическом изучении глаза в зоне лимба и прилегающих от-

делах роговицы и конъюнктивы наблюдалась полная их эпителизация. Передний эпителий роговицы состоял из 4-5 рядов клеток. Эпителиоциты базального слоя крупные с округлым или овальным базофильным ядром, вышележащие 1-2 ряда клеток несколько меньших размеров, с несколько вытянутым ядром. Поверхностные 1-2 ряда клеток и их ядра были резко уплощены. Передний эпителий роговицы постепенно переходил в многослойный плоский неороговевающий эпителий конъюнктивы. Отдельные эпителиоциты поверхностных отделов эпителия роговицы и конъюнктивы были увеличены в объеме с оптически светлой цитоплазмой и сморщенным ядром. Базальная мембрана эпителия роговицы и конъюнктивы при ШИК-реакции определялась в виде тонкой гомогенной полоски. Под базальной мембраной роговицы определялась тонкая равномерно выраженная умеренно фуксинофильная боуменова оболочка, заканчивающаяся несколько не доходя лимба.

В поверхностной зоне собственного вещества роговицы в зоне лимба определялись немногочисленные тонкостенные кровеносные с тонкой ШИК-позитивной базальной мембраной, на которой лежали вытянутой формы эндотелиоциты с несколько набухшими слабо базофильными ядрами. Между сосудами лежали тонкие умеренно фуксинофильные коллагеновые волокна, фибробласты, макрофаги, немногочисленные лимфоциты и эозинофилы. В поверхностной зоне собственного вещества роговицы, примыкающего к лимбу, наблюдалось появление тонких фуксинофильных волокон, среди которых встречались кератобласты, макрофаги, мелкие запусевающие сосуды. Просветы сосудов были сужены (см. рис.2). Клетки несколько напоминали фибробласты, но отличались от последних меньшими размерами, как самих клеток, так и их ядер. Клетки с узким ободком слабо эозинофильной цитоплазмы и с базофильным, неправильной или несколько вытянутой формы ядром с 1-2 ядрышками. Часть клеток с гиперхромными ядрами, единичными фигурами митоза.

В зоне лимба собственное вещество роговицы было представлено параллельно лежащими и взаимопересекающимися под углом тонкими пла-

стинками, состоящими из умеренно фуксинофильных коллагеновых волокон различной толщины, между которыми определялось умеренно ШИК-положительное аморфное вещество, немногочисленные кератинобласты с крупным овальным слабо базофильным ядром, единичные лимфоциты, эозинофилы, моноциты. Собственное вещество роговицы под острым углом переходило в собственное вещество склеры, состоящее из интенсивно фуксинофильных пучков коллагеновых волокон, с единичными клеточными элементами между ними. В нижней трети места перехода роговицы в склеру определялись сосуды венозного синуса склеры в виде неправильной формы тонкостенных полостей, выстланных уплощенными эндотелиоцитами, лежащими на тонкой умеренно ШИК-положительной мембране. Десцеметова оболочка граничила с нижним краем собственного вещества и определялась в виде тонкой непрерывной интенсивно фуксинофильной пластинки, разволокняющейся и переходящей в зоне лимба в склеру. Со стороны внутренней камеры к десцеметовой оболочке прилежал ряд уплощенных клеток с полиморфными базофильными ядрами - задний эпителий, который в зоне лимба переходил на корнеосклеральные трабекулы.

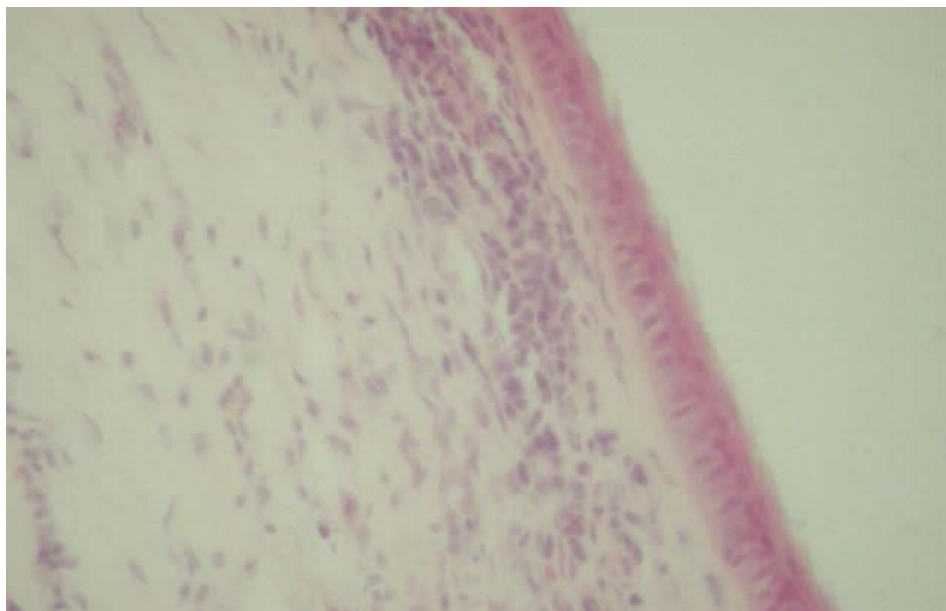


Рис. 2. Зона конъюнктивальной иммобилизации. Ровная поверхность роговицы с дифференцированным роговичным эпителием. Окраска гематоксилином и эозином. Ув х 200.

В контрольной группе животных на 14 сутки после дезэпителизации (по Милюдину) отмечался конъюнктивальный паннус, деструкция базальной мембраны, с уменьшением полиморфноядерных лейкоцитов в поверхностных слоях стромы и увеличением количества фибробластов, что говорило об исчезновении воспаления. Отмечалось наличие новообразованных сосудов.

Исходя из полученных экспериментальных данных можно утверждать, что операция по фиксации культивированных клеток лимбального эпителия под аутоконъюнктиву, при частичной лимбальной недостаточности, восстанавливает полноценный роговичный эпителий, за счет миграции и дифференцировки клеток аутотрансплантата.

Выводы.

1. Разработан в эксперименте, на модели частичной лимбальной недостаточности, способ трансплантации выращенных в культуре аутологичных клеток лимба на лимб повреждённого глаза с покрытием аутоконъюнктивой – конъюнктивальная иммобилизация.

2. При культивировании лимбальных эпителиоцитов отмечена высокая пролиферативная активность, с увеличением их плотности в 3 раза через 2,5 дня от начала культивирования.

3. Установлено отсутствие признаков конъюнктивизации роговой оболочки (помутнения и неоваскуляризации) после конъюнктивальной иммобилизации суспензии культивированных *in vitro* аутологичных клеток лимба, содержащей стволовые клетки лимба, у животных с экспериментальной частичной лимбальной недостаточностью.

4. Обнаружена полная эпителизация дефекта роговицы с четкой дифференцировкой переднего эпителия по слоям через 2 недели после конъюнктивальной иммобилизации аутологичных клеток лимба в глазах животных с предварительно смоделированной частичной лимбальной недостаточностью.

Список литературы.

1. Герасименко В.Г. Биотехнология. - Киев: Выща школа, 1989. - 343 с.
2. Гринберг К.Н., Кухаренко В.И., Ляшко В.Н. Культивирование фибробластов человека для диагностики наследственных болезней // Методы культивирования клеток. - Л.: Наука, 1988. – С. 251 - 260.
3. Завертляев Б.П. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота. - Л.: Агропромиздат, 1989. - 255 с.
4. Какпаков В.Т. Культивирование клеток и тканей беспозвоночных // Методы культивирования клеток. - Л.: Наука, 1988. - С. 241 - 250.
5. Лилли Р. Методическое руководство по гистологической технике и гистохимии. – М.: Наука, 1960. – С. 34.
6. Милюдин Е. С. Экспериментальная модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия // Вестник СамГУ - Естественнонаучная серия, 2006, №9 (49), с. 219.
7. Пирс Э. Методическое руководство по гистологической технике и гистохимии. – М.: Наука, 1962. – С.73.
8. Репин В.С. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. – М.: "Реметэкс", 2002. – 165с.
9. Amano S. Comparative study of intraoperative mitomycin C and irradiation in pterygium surgery // Br. J. Ophthalmol. – 2000. – Vol. 84. – P.618–621.
10. Grueterich M., Espana E.M., Tseng S.C.G. Ex Vivo Expansion of Limbal Epithelial Stem Cell: Amniotic Membrane Serving as a Stem Cell Niche // Survey of Ophthalmol. – 2003. – Vol. 48 (6). – P. 631 – 646.
11. Hazlett L.D. Epithelial desquamation in the adult mouse cornea: A correlative TEM-SEM study // Ophthalmic Res. – 1980. – Vol. 12. – P.315.
12. He Y., Sun B., Ding X. Limbal epithelial autograft transplantation for treatment of unilateral fibrous vascularized cornea caused by chemical burns // Chung-Hua-Yen-Ko-Tsa-Chih. – 1996. – Vol. 32 (1). – P.11–14.

13. Kenyon K.R., Tseng S.C.G. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders // *Ophthalmology*. – 1989. – Vol. 96 – P.709 – 723.
14. Kinoshita S., Koizumi N., Nakamura T. Transplantable cultivated epithelial sheet for ocular surface reconstruction // *Exp. Eye research*. – 2004. – Vol. 78 – P. 483 – 491.
15. Lavker R., Tseng S., Sun T. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle // *Experimental eye research*. – 2004. – Vol. 78. – P. 433 – 446.
16. Pfister R. R. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells // *CLAO-J*. –1994. – Vol. 20 (1). – P.64–72.
17. Tsai R. J. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. / Tsai R. J., Li L.M., Chen J.K. // *N Engl J Med*. – 2000. – Vol. 343. – P.86–93.

Регенерация поверхностного эпителия роговицы после трансплантации суспензии лимбальных клеток, культивированных *in vitro*, в эксперименте, на модели частичной лимбальной недостаточности.

П. А. Бездетко, Е. Н. Ильина, О.В. Наумова, Ю. Е. Микулинский, С. Г. Панибратцева

Ключевые слова: частичная лимбальная недостаточность, аутологичные клетки лимба, трансплантация.

Изучалась регенерация поверхностного эпителия роговицы после пересадки суспензии культивированных *in vitro* аутологичных лимбальных клеток на экспериментальной модели частичной лимбальной недостаточности. Было прооперировано 14 кроликов породы Шиншилла, которым на глаза с предварительно смоделированной частичной лимбальной недостаточностью под аутоконъюнктиву пересажен аутооттрансплантат, полученный с здоровых глаз кроликов и лабораторно культивированный. В результате операции

наступила полная эпителизация дефекта роговицы с четкой дифференцировкой переднего эпителия на слои.

Регенерація поверхневого епітелію рогівки після трансплантації суспензії лімбальних клітин, культивованих *in vitro*, у експерименті, на моделі часткової лімбальної недостатності.

П. А. Бездітко, Є. М. Ільїна, О. В. Наумова, Ю. Ю. Микулинський, С. Г. Панібратцева

Ключові слова: часткова лімбальна недостатність, аутологічні клітини лімба, трансплантація.

Вивчалась регенерація поверхневого епітелію рогівки після пересадки суспензії культивованих *in vitro* аутологічних лімбальних клітин на експериментальній моделі часткової лімбальної недостатності. Було прооперовано 14 кролів породи Шиншила, у яких на очі з попередньою моделлю

попередньою моделлю частковою лімбальною недостатністю під аутокон'юнктиву був пересаджено аутографт, взятий зі здорових очей кролей та лабораторно культивованих. Це дозволило досягти повної епітелізації рогівкового дефекту з диференціацією переднього епітелію на шари.

Regeneration of corneal epithelium after autograft transplantation at the stem cell deficiency in experiment.

P. Bezdetko, Y. Ilyina, O. Naumova, Y. Mikulinskiy, S. Panibratseva

Keywords: the stem cell deficiency, the autologous limbal cells, the transplantation, the autograft.

The study was performed on 14 rabbits with the experimental model of the stem cell deficiency. They received the autograft transplantation on the cornea with the autoconjunctiva covering. Autograft was cultivated from the autologous stem cells of the healthy eye (limbal biopsy [1 x 2 x 0.35 mm] was performed on normal contralateral eyes on 12 h). This surgical treatment let us to stop the conjunctivization and neovascularization of the cornea, improve the repair of the an-

terior segment of the injuring eyes and restoring the corneal transparency. It has allowed to achieve full epitalization of corneal defect with an accurate differentiation forward epithelium on layers.