УДК 617.713-002-0.2:616.833.15-085-036.8-092.2

Н.В. Пасечникова, Г.И. Дрожжина, О.Н. Иванова, А.Г. Попандопуло, А.С. Кавелина, Т.Б. Гайдамака

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМНУ», г. Одесса
****ГУ «ИНВХ им. В.К. Гусака НАМНУ», г. Донецк***

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НА МОДЕЛИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО КЕРАТИТА (КЕРАТОПАТИИ)

Изучали влияние клеточной терапии идентифицированной культуры эпителиальных лимбальных клеток роговицы человека на процессы регенерации поверхности роговицы на разработанной модели нейротрофической кератопатии (кератита). На модели нейротрофической кератопатии (кератита) впервые в Украине установлено, что субконъюнктивальное введение суспензионной культуры лимбальных эпителиальных клеток роговицы в дозе 1 млн. в 0,2 мл физраствора, включающей в состав стволовые клетки, позволяет значительно ускорить процессы регенерации роговичной ткани.

Ключевые слова: *клеточная терапия, модель нейротрофического кератита, нейротрофическая кератопатия.*

За последние десятилетия в патологии органа зрения резко возрос удельный вес дистрофических заболеваний роговицы, которые становятся одной из ведущих причин слабовидения и слепоты. Особое место среди них занимает нейротрофическая кератопатия, или нейротрофический кератит. Вопросам этиологии, патогенеза, лечения данной патологии посвящено большое количество работ отечественных и зарубежных авторов. Несмотря на это проблема нейротрофической кератопатии еще достаточно далека от своего решения.

Установлено, что чувствительные нервы роговицы играют ключевую роль в поддержании анатомической целостности и функционирования роговой оболочки, особенно ее эпителия. Экспериментальными и клиническими исследованиями доказан, с одной стороны, двусторонний контроль пролиферации роговичного эпителия благодаря взаимодействию сенсорных нейромедиаторов, ускоряющих митоз эпителиальных клеток, а, с другой стороны, воздействие симпатических медиаторов, тормозящих митоз эпителиальных клеток [1–3]. В 2003 г. на Кембриджском офтальмологическом симпозиуме было сформулировано определение нейротрофической кератопатии как дегенеративного заболевания роговицы, индуцируемого поражением тройничного нерва, которое приводит к снижению или потере чувствительности роговицы, уменьшению слезопродукции и, как следствие, — к нарушению регенерации роговицы. Литературные данные указывают на то, что поражение пятой пары черепно-мозговых нервов может происходить на разных уровнях (в ядре, гассеровом узле, на уровне глазной ветви тройничного нерва, назоцилиарного или длинных цилиарных нервов) и наблюдается при различных заболеваниях поверхности глаза, системных заболеваний организма, а также после хирургических вмешательств.

Наиболее частыми причинами снижения чувствительности роговицы являются вирусные инфекции (герпес Simplex и герпес Zoster), хронические повреждения или воспалительные заболевания поверхности глаза с развитием синдрома лимбальной недостаточности, ношение контактных линз, наследственные дистрофии роговицы, последствия химических ожогов, травм, парезы пятой пары черепно-мозговых нервов, в том числе после удаления невринома слухового нерва, менингиом и аневризм, хирургические операции на роговице (фоторефракционная кератэктомия, LASIK, ке-

© *Н.В. Пасечникова, Г.И. Дрожжина, О.Н. Иванова и др., 2011*

ратопластика и др.) и на глазу (после хирургических и лазерных вмешательств, циркляжа силиконовой лентой, витрэктомии (травма или сдавливание цилиарных нервов), а также в результате токсического влияния лекарственных препаратов.

Согласно классификации Y.A. Makie (1995 г.) в клиническом течении нейротрофической кератопатии выделены три стадии. Первая стадия характеризуется точечной кератопатией, гиперплазией эпителия и его иррегулярностью, поверхностной неоваскуляризацией и образованием помутнения в строме. Вторая стадия характеризуется наличием персистирующих дефектов эпителия, отеком стромы, складками десцеметовой мембраны, возможна воспалительная реакция во влаге передней камеры, иногда с наличием стерильного гипопиона. Для третьей стадии характерно вовлечение в патологический процесс стромы с формированием язвы роговицы, которая может осложняться расплавлением стромы, перфорацией и вести к потере зрения и глаза.

Несмотря на большой арсенал лекарственных препаратов и подходов к лечению нейротрофической кератопатии, до настоящего времени лечение данной патологии роговицы является одним из самых трудных в офтальмологии.

Для стимуляции регенерации роговичной ткани используют консервативные и хирургические методы. С тектонической целью в качестве временного покрытия поверхности роговицы используются различные материалы и способы их применения: лечебные мягкие контактные линзы, трансплантация донорской роговицы и конъюнктивы, амниотической мембраны, культивированных фетальных фибробластов и взрослых стволовых клеток как самостоятельно, так и на различных подложках, лимбальных ауто- и аллотрансплантатов.

Исследования последних лет направлены на совершенствование технологии культивирования фетальных фибробластов, лимбальных клеток, а также эпителиальных, стромальных, эндотелиальных клеток роговицы, разработку способов фиксации и доставки этих клеток в ткани роговицы, а также выяснение тонких механизмов регуляции процессов дифференцировки стволовых клеток, после трансплантации их на поверхность глаза, что является актуальной проблемой офтальмологии [4, 5].

В настоящее время применение культивированных клеток роговицы рассматривают как наиболее перспективный метод, позволяющий стимулировать репаративные процессы поврежденных тканей, при различных патологических процессах роговой оболочки, возникших вследствие синдрома лимбальной недостаточности. Синдром лимбальной недостаточности характеризуется наличием конъюнктивального паннуса, хронического воспаления и помутнения роговицы различной степени выраженности, неоваскуляризации, плохого взаимодействия эпителиальнах клеток, которое проявляется неровностью поверхности, рецидивирующими эрозиями и язвами, деструкцией базальной мембраны.

В последние годы изучается возможность применения новой технологии, называемой культивированием (прижизненное донорство) *ex vivo* эпителиальных стволовых клеток, которая позволяет избежать потенциальных осложнений, значительно упрощает процедуру забора материала (биопсии) для выращивания, строгого тестирования как материала, так и собственно донора. Такой подход, кроме того, лишен морально-этических и социальных ограничений, появляющихся при использовании эмбрионального материала.

Экспериментальными исследованиями было доказано, что для длительного культивирования и размножения различных типов эпителиальных клеток необходимо наличие питательной среды либо субстрата, достаточное количество факторов роста и цитокинов [6]. Существуют различные модели культивирования клеток эпителия и стволовых клеток. В 1982 г. Friend et al. предложили способ культивирования роговичных эпителиальных клеток на базальной мембране, полученной из роговиц кроликов. В дальнейшем была изучена возможность применения других субстратов, таких как гидрогель, покрытый фибронектином, коллагеновые матрицы, контактные линзы, фибрин и т. д., для культивирования эпителия *ex vivo*.

Разными исследователями *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано, что амниотическая мембрана может быть успешно использована в качестве субстрата для культивирования эпителиальных стволовых клеток и их последующего применения в лечении тяжелой патологии поверхности глаза, протекающей с синдромом лимбальной недостаточности. Для идентификации культивированных клеток применяются иммуногистохимические методы с помо-

щью специфических маркеров: p63, кератинсульфатов, цитокератинов 3/12, позволяющих определить видовую принадлежность клеток.

Для изучения регенерации ткани роговицы предлагались различные экспериментальные модели формирования лимбальной недостаточности и нейротрофического кератита (кератопатии). В основе этих моделей лежит термическое, химическое или токсическое повреждение роговичной ткани либо оказывается деструктивное воздействие на глазную ветвь тройничного нерва. Учитывая перечисленные недостатки, мы разработали модель нейротрофического кератита, максимально приближенную к клиническим условиям (приоритетная справка № 201106827) [7].

Целью нашего исследования явилось изучение эффективности влияния клеточной терапии идентифицированной культуры эпителиальных лимбальных клеток роговицы человека на процессы регенерации поверхности роговицы на разработанной модели нейротрофической кератопатии (кератита).

Материал и методы. Экспериментальное исследование было одобрено биоэтическим комитетом ГУ «Института глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины».

Выделение и культивирование лимбальных клеток роговицы проводили в лаборатории клеточного и тканевого культивирования «ИНВХ им. В. К. Гусака», отвечающей стандартам GMP с соблюдением асептических условий. С поверхности донорской роговицы выделяли зоны палисада Фогта, содержащие наибольшее количество лимбальных стволовых клеток с последующей инкубацией в коллагеназе при температуре 37 °С 10 мин, затем поверхность соскабливали для отделения эпителия от нижележащей стромы. Для выделения использовали питательную среду DMEM/F12 1:2, содержащую 10 % ЭТС, антибиотики и ростовые факторы. Суспензию клеток на 6-луночном плато культивировали в CO_2 инкубаторе, содержащем 95 % влаги при температуре 37 °С. После достижения конфлюэнтного слоя проводили пассирование с предварительным промыванием культуры буферным раствором. Наблюдение осуществлялось с помощью светового микроскопа фирмы Leika.

Иммуногистохимические методы идентификации клеток проводили с использованием специфических маркеров. На ранних пассажах для доказательства наличия стволовых клеток в культуре использовали P63, который является маркером транскрипции. На более поздних пассажах для подтверждения дифференцировки культуру клеток окрашивали цитокератином 3/12 — маркером, который экспрессируется только в клетках роговицы. Пан-цитокератин положительным окрашиванием подтвердил эпителиальное происхождение клеток. Виментин своим цитоплазматическим положительным окрашиванием доказал принадлежность к клеткам мезенхимального происхождения. Происхождение базальных клеток лимба подтвердилось положительным окрашиванием цитокератином 19.

Моделирование нейротрофического кератита (кератопатии) проводили в виварии ГУ «Института глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины». Наблюдение, уход, оперативное вмешательство на животных, а также выведение их из эксперимента выполняли в соответствии с международными правилами по работе с опытными животными (Хельсинская декларация об использовании животных в экспериментальных исследованиях, 1964–2000).

Для моделирования нейротрофического кератита в условиях *in vivo* использовали 10 кроликов (20 глаз) породы шиншилла массой 2–3,5 кг. Модель предполагала наложение циркляжа на глазное яблоко силиконовой лентой, что приводило к нарушению иннервации и питания зоны лимба; формирование дефекта стромы в центре роговицы диаметром 6,0 мм и глубиной на 1/3 толщины; торможение регенерации роговицы инстилляциями кортикостероидов в конъюнктивальную полость 3 раза в сутки. За состоянием роговицы наблюдали в динамике с помощью бокового фокального освещения, биомикроскопии с флюоресцеиновым тестом, фоторегистрации. После выведения животных из эксперимента проводили морфологическое исследование.

Через 1 сутки от начала эксперимента биомикроскопическая картина выявила наличие светобоязни, скудного слизистого отделяемого, прокрашивания роговицы в области стромэктомии и за ее пределами до 7 мм в диаметре. Окружающая ткань собственной роговицы оставалась прозрачной. На 3-и сутки отмечали сохранение светобоязни, увеличение слизистого отделяемого, дефект роговицы в пределах стромэктомии ограничился, с окрашиванием флюо-

ресцеином до 5,5 мм в диаметре, поверхность окружающей роговицы пропитывалась по типу эпителиопатии, с нежным разряжением ткани в слоях. Через 5 суток у экспериментальных животных сохранялась светобоязнь, снизилась слезопродукция, отмечалось умеренное количество слизистого нитчатого отделяемого. В центре стромэктомии дефект поверхностных слоев роговой оболочки ограничился до 0,5–1,0 мм, на остальном протяжении пропитывался флюоресцеином по типу эпителиопатии. Окружающие ткани роговицы оставались почти прозрачными. На 8-е сутки от начала эксперимента проба Ширмера составляла 4,8–5,0 мм, вся поверхность роговицы кроликов заэпителизировалась. Однако поверхность эпителия была иррегулярной, в нижнем отделе роговица по ходу пограничного кольца стромэктомии пропитывалась флюоресцеином по типу эпителиопатии. К 14-м суткам после завершения эпителизации дефекта поверхностных слоев стромы начали формироваться нейротрофические изменения, которые биомикроскопически проявлялись снижением слезопродукции, наличием слизистого нитчатого отделяемого в конъюнктивальной полости, точечной кератопатией, гиперплазией и иррегулярностью эпителия, наличием поверхностной неоваскуляризации. Через 19 суток от начала эксперимента появлялись персистирующие дефекты эпителия роговицы, с отеком и помутнением стромы. К 29-м суткам — при биомикроскопии роговицы экспериментальных животных к ранее описанным трофическим изменениям присоединились нежные складки десцеметовой оболочки, эффект Тиндаля во влаге передней камеры. На 30-е сутки при наличии четких клинических признаков нейротрофического кератита (кератопатии) начинали исследование влияния культуры лимбальных эпителиальных клеток на процессы регенерации эпителия и передних слоев стромы роговицы.

Для этого на обоих глазах дополнительно удаляли передний эпителий в пределах ранее проведенной стромэктомии (6 мм). В глаза опытной группы (10 глаз) вводили субконъюнктивально в области лимба однократно с четырех точек на 3, 6, 9 и 12 часах суспензию культуры лимбальных эпителиальных стволовых клеток в дозе 1 млн. в 0,2 мл физраствора. Парные глаза (10 глаз) животных являлись контролем.

Результаты. Установлено, что у животных опытной группы на 6 глазах спустя 1 сутки от начала эксперимента диаметр дефекта поверхностных слоев роговицы составил 1–1,5 мм, а на 4 глазах — 3,5–4 мм. В то же время у всех кроликов группы без введения культуры клеток (10 глаз) диаметр сформированного дефекта сохранялся первоначальным (в пределах 6 мм).

Спустя 2 суток у 8 животных опытной группы произошла полная эпителизация раневой поверхности и только на 2 глазах сохранился дефект диаметром 1 мм. В те же сроки наблюдения у кроликов контрольной группы на 8 глазах дефект эпителиального покрова и передних слоев стромы роговицы составил 4,5–5,0 мм, а на 2 глазах оставался в пределах 6 мм.

При дальнейшем наблюдении к 14-м суткам после введения культуры лимбальных эпителиальных стволовых клеток у всех животных опытной группы произошла эпителизация сформированного дефекта с полноценной дифференцировкой эпителиального покрова, а в поверхностных слоях роговицы сформировалось нежное облачковидное помутнение в пределах стромэктомии.

В контрольной группе у 7 кроликов несмотря на завершение эпителизации дефекта выявлялись признаки неполной дифференциации эпителия, а в верхних стромальных слоях формировалось помутнение средней интенсивности, на 3 глазах сохранялась эпителиопатия с формированием более грубого стромального помутнения.

Таким образом, на модели нейротрофической кератопатии (кератита) впервые в Украине установлено, что субконъюнктивальное введение суспензионной культуры лимбальных эпителиальных клеток роговицы в дозе 1 млн. в 0,2 мл физраствора, включающей в свой состав стволовые клетки, позволяет значительно ускорить процессы регенерации роговичной ткани. Применение клеточной терапии в клинике для лечения такого тяжелого дегенеративного заболевания, как нейротрофический кератит (кератопатия), представляется весьма перспективным.

Список литературы

1. *Пальцев М.А.* Биология стволовых клеток и клеточные технологии / М. А. Пальцев. — М. : Медицина — Шико, 2009. — Т. 2.

2. Neurotrophic keratitis / S. Bonini, P. Rama, D. Olzi1, A. Lambiase // Eye. — 2003. — V. 17. — P. 989–995.

3. A novel mouse model for neurotrophic keratopathy: trigeminal nerve stereotactic electrolysis through the brain / G. Ferrari, S. K. Chauhan, H. Ueno [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2011. — Apr. 19. — V. 52 (5). — P. 2532–2539.

4. Restoration of corneal epithelial barrier function and wound healing by substance P and IGF-1 in rats with capsaicin-induced neurotrophic keratopathy / M. Nakamura, M. Kawahara, K. Nakata, T. Nishida // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2003. — V. 44. — P. 2937–2940.

5. *Lavker R.* Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle / R. Lavker, S. Tseng, T. Sun // Experimental Eye Research. — 2004. — V. 78. — P. 433–446.

6. *Милюдин Е. С.* Экспериментальная модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия / Е. С. Милюдин // Вестник СамГУ Сер. Естественные науки. — 2006. — № 9 (49). — С. 219–226.

7. Пат. Украины. Модель нейротрофического кератита / Дрожжина Г. И., Иванова О. Н., Гайдамака Т. Б. — Приорит. справка № 201106827. — Опубл. 2011.

Н.В. Пасечнікова, Г.І. Дрожжіна, О.М. Іванова, А.Г. Попандопуло, А.С. Кавеліна, Т.Б. Гайдамака

ЕФЕКТИВНІСТЬ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ НА МОДЕЛІ НЕЙРОТРОФІЧНОГО КЕРАТИТУ (КЕРАТОПАТІЇ)

Вивчали вплив клітинної терапії ідентифікованої культури епітеліальних лімбальних клітин рогівки людини на процеси регенерації поверхні рогівки на розробленій моделі нейротрофічної кератопатії (кератиту). На моделі нейротрофічної кератопатії (кератиту) вперше в Україні встановлено, що субкон'юнктивальне введення суспензійної культури лімбальних епітеліальних клітин рогівки в дозі 1 млн. у 0,2 мл фізрозчину, що включає в склад стволові клітини, дозволяє значно прискорити процеси регенерації тканини рогівки.

Ключові слова: *клітинна терапія, модель нейротрофічного кератиту, нейротрофічна кератопатія.*

N.V. Pasechnikova, G.I. Drozhzhyna, O.N. Ivanova, A.G. Popandopulo, A.S. Kavelina, T.B. Gaydamaka

EFFICIENCY OF STEM CELL THERAPY ON THE MODEL OF NEUROTROPHIC KERATITIS (KERATOPATHY)

The influence of stem cell of limbal epithelial cells culture human cornea on the corneal surface regeneration processes at the experimental model of neurotrophic keratitis (keratopathy) was studied. On neurotrophic keratopathy model at first in the Ukraine have determined, that usage of stem cells therapy have positive influence on regenerative processes of damaged corneal tissue: 1 mln. cells subconjunctival injection hase forced the epithelization of corneal stromal superficial defect.

Key words: *stem cell therapy, model of neurotrophic keratitis, neurotrophic keratopathy.*