

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РОГОВИЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПОСЛЕ ПЕРЕСАДКИ АУТОТРАНСПЛАНТАТА ПРИ 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

*Вивчалися особливості відновлення рогівкового епітелію після пересадки аутоотрансплантанта при лімбальній недостатності в експерименті. Було прооперовано 10 кроликів породи шиншила, яким на очі із попередньо смодельованою лімбальною недостатністю в сформовану лімбальну кишеню був трансплантован аутоотрансплантат на фібрinovому субстраті, взятий із контрлатеральних здорових очей кролей з наступним його культивуванням в лабораторних умовах. Це дозволило уникнути подальшого розвитку кон'юнктивізації рогівки, знизити (до повного уникнення) неоваскуляризацію і помутніння рогівки, та досягти повної епітелізації дефекту рогівки із чіткою диференціацією переднього епітелію на шари.*

**Ключевые слова:** лимбальная недостаточность, аутологичные клетки лимба, аутоотрансплантат.

**Ключові слова:** лімбальна недостатність, аутологічні клітини лимба, аутоотрансплантат.

**Введение.** Роговичный эпителий это плоский неороговевающий многослойный эпителий, состоящий из 5–6 слоёв клеток. Основными его функциями являются регенерация после повреждения и защитная, обеспечивающая стабильность слёзной плёнки [10, 13]. Восстановление поверхностного эпителия при его повреждениях происходит за счёт деления и миграции базальных эпителиоцитов роговой оболочки, а также трансформации и центростремительного движения камбиальных (стволовых) клеток лимба [13,14]. Стволовые клетки лимба расположены в базальном эпителии [14,15,16]. При возникновении дефекта на поверхности роговицы они способны мигрировать в область повреждения. При их недостаточности возникает патологическое состояние, называемое конъюнктивизацией роговой оболочки или синдромом лимбальной недостаточности [11,14]. Оно характеризуется следующими признаками: наличием конъюнктивального паннуса, хронического воспаления, помутнения, неоваскуляризации роговицы, неровной поверхности роговой оболочки, рецидивирующих эрозий и/или язв, деструкции базальной мембраны. Данные изменения приводят к значительному снижению зрения [10,14].

Одним из наиболее современных методов лечения является аутолимбальная трансплантация, при которой клетки лимба берутся с контрлатерального здорового глаза [12, 14 — 16]. Существуют проблемы по выделению, культивированию и фиксации аутологичных лимбальных клеток как метода лечения данной патологии. Именно это и определило **цель нашего исследования:** изучить особенности форми-

рования полноценного роговичного эпителия при лимбальной недостаточности после пересадки аутоотрансплантанта.

Необходимость экспериментальных исследований на животных обусловлена тем, что ряд вопросов: особенности регенерации роговичного эпителия при лимбальной недостаточности, эффективность фиксации аутоотрансплантата в лимбальном кармане, закономерности формирования функционально-морфологической полноценности эпителия в зоне роговичного дефекта после пересадки аутоотрансплантата не могли быть решены в условиях клиники.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Экспериментальное исследование было выполнено на 25 кроликах породы «шиншила», массой 3-5кг, содержащихся в условиях вивария ХНМУ. Всем животным была смоделирована правосторонняя лимбальная недостаточность без механического повреждения лимбальной зоны по Милюдину, 2006г [6,9].

Экспериментальную группу составили 10 кроликов, у которых на глазах с развившейся лимбальной недостаточностью, в области лимба, в меридиане роговичного дефекта формировался карман, куда имплантировался лимбальный аутоотрансплантат. Он был получен путём культивирования участка лимба, размерами 1×2мм, до 1/3 его толщины, взятого из здоровых глаз кроликов экспериментальной группы методом ламеллярной кератэктомии на 12 часах. Фрагменты ткани, полученные из зоны лимба кролика, доставляли в лабораторию в стерильной бакпечатке с 5 мл транспортной среды для дальнейшего культивирования [3,4]. После удаления транспортной среды ткань инкубировали в 0,25% растворе трипсина в течение 20 минут при 37°С. Трипсин за-

тем удаляли, ткань ресуспендировали в среде DMEM и F12 (1:1) (Sigma, США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (Sigma, США) и 50мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения), а затем центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 2 мл свежей культуральной среды, после чего клетки рассеивали в 10 мл среды в культуральный сосуд 80 см<sup>2</sup> и культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Через 24 часа добавляли свежую среду и продолжали культивировать оставшиеся прикрепленными ко дну сосуда клетки еще сутки, до образования клеточного монослоя. Затем к клеткам добавляли охлажденный до 4°C 0,25%-раствор трипсина. Через 30 секунд трипсин удаляли, а клетки инкубировали 10 мин при 37°C. Открепившиеся от культурального сосуда лимбальные клетки ресуспендировали в 5 мл культуральной среды и осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 2 мл культуральной среды [1- 4,8]. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева [4].

Лимбальные клетки биоптата, забор которого осуществлялся из здоровых глаз кроликов, обладали выраженной адгезией и образовывали на дне культурального флакона колонии. Клетки имели достаточно высокую пролиферативную активность. До культивирования количество клеток составляло 23±7,9 на мм<sup>2</sup>. Через 24 часа их количество удвоилось — (49±1,7) кл. / мм<sup>2</sup>; p<0,001\*. Через (58,9±5,6) часов образовался монослой с их утроенным количеством (71±6,3) кл. / на мм<sup>2</sup>; p<0,0001\* (рис 1).

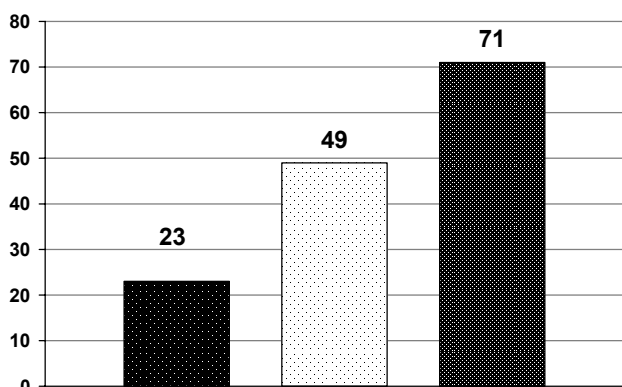


Рис 1. Концентрация культивированных лимбальных клеток кроликов (количество клеток на мм<sup>2</sup>). p<0,001\* через 24 часа, p<0,0001\* через 58,9±5,6 часов.

Клетки рассеивали на биodeградируемые фибриновые пленки диаметром 0,5см, полученные из плазмы крови этих же кроликов. Таким образом, был сформирован аутотрансплантат, впоследствии пересаженный на глаза кроликов, с предварительно смоделированной лимбальной недостаточностью.

Контрольную группу составили 15 кроликов с экспериментально полученной лимбальной недостаточностью, получавшие местное консервативное лечение репарантами (1% тиотриазолин, корнерегель). Для профилактики присоединения вторичной бактериальной инфекции у всех животных использовался антибактериальный препарат флоксал.

В послеоперационном периоде за кроликами вели тщательное наблюдение, суммарно оценивая их общее состояние, с учетом внешнего вида, поведения и отношения к пище; измеряли температуру тела и т. д. Наблюдение за состоянием глаз животных и восстановлением целостности роговничного эпителия 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: наличие перикорнеальной инъекции, характеристика дефекта роговничного эпителия (площадь, глубина, локализация). Интенсивность помутнения роговицы оценивалась по четырехбалльной 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 также по 4-х балльной шкале (Инатоми Т., Япония, 2006г.): 0 — отсутствие неоваскуляризации; 1 — периферическая васкуляризация (в области лимба); 2 — пери- и окологимбальная 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 через ушную артерию. Материал для морфологического исследования забирался на 7, 14 сутки. Основой для морфологического исследования послужили глазные яблоки животных обеих групп. Гистологические и гистохимические методики выполнялись по прописям, изложенным в руководствах по гистологической технике и гистохимии [5,7].

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Распределение животных по срокам наблюдения представлено в таблице 1.

Таблица 1

Распределение животных по срокам наблюдения

Группы животных	Сроки исследования после операции		
	на 3 сутки	на 7 сутки	на 14 сутки
Экспериментальная (n=10)	10	10	5
Контрольная (n=15)	15	15	10

В послеоперационном периоде наблюдалось спокойное течение, нагноения, потери трансплантата не отмечалось. Все прооперированные животные сохраняли свою активность и аппетит. Температура тела незначительно (37,1±0,1°C) повышалась на протяжении первых двух суток послеоперационного периода. На третьи сутки в обеих группах отмечалась умеренная перикорнеальная инъекция, на 7 сутки — лёгкая, на 14 сутки инъекция отсутствовала, различия не достоверны, p>0,01. Исчезновение перикорнеальной инъекции отмечено в экспериментальной группе на (6,5±0,4) сутки, в контроле на (6,8±0,7)сутки, различие не достоверно, p>0,01.

В экспериментальной группе после операции отмечалась частичная эпителизация дефекта роговой оболочки — в среднем на (3,8±0,4) сутки, с не-

ровностью её поверхности. Аутотрансплантат плотно прилежал в месте фиксации.

В группе контроля на третьи 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 напознал на роговицу в виде вала с периферии. Частичная эпителизация отмечена на  $(6,7 \pm 0,2)$  сутки,  $p < 0,01^*$ .

На 7 сутки в экспериментальной группе отмечена макроскопически неполная эпителизация роговичного дефекта (полная эпителизация отмечена на  $8,9 \pm 1,1$  сутки) поверхность роговицы ровная, гладкая. В месте формирования лимбального кармана, в области шва — утолщение эпителия, фрагменты лизирующейся фибриновой подложки.

В группе контроля на 7 сутки дефект эпителия отсутствовал. Поверхность роговой оболочки была неровной. Полная эпителизация наступила на  $(14,1 \pm 0,9)$  сутки,  $p < 0,001^*$ .

В экспериментальной группе на 14 сутки глаза спокойные, без макропризнаков воспаления. Полный лизис аутотрансплантата с фибриновой подложкой. Макроскопически врастания конъюнктивного эпителия на поверхность роговой оболочки не наблюдалось.

Интенсивность помутнения в динамике представлена в таблице 2. В экспериментальной группе помутнение отсутствовало на протяжении всего срока наблюдения.

Таблица 2

**Динамика помутнения роговой оболочки (в баллах)**

Группы наблюдения	Сроки наблюдения после операции		
	на 3 сутки	на 7 сутки	на 14 сутки
Экспериментальная	0	0	0
Контрольная	$0,5 \pm 0,9$	$0,9 \pm 1,1$	$1,4 \pm 0,9$
Достоверность различий	$p < 0,01^*$	$p < 0,01^*$	$p < 0,001^*$

Степень неоваскуляризации в динамике отражена в таблице 3. В экспериментальной группе неоваскуляризация отсутствовала в течение всего периода наблюдения.

Таблица 3

**Динамика неоваскуляризации роговицы (в баллах)**

Группы наблюдения	Сроки наблюдения после операции		
	на 3 сутки	на 7 сутки	на 14 сутки
Экспериментальная	0	0	0
Контрольная	$0,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,5$
Достоверность различий	$p < 0,01^*$	$p < 0,001^*$	$p < 0,0001^*$

Морфологические результаты лимбокератопломбирования: микроскопически на 7 день после

операции на поперечном разрезе глаза обнаруживается утолщение зоны лимба за счет находящегося в роговично-склерально-лимбальном кармане аутотрансплантата. Передний эпителий роговицы неравномерной толщины — от 3-4 до 11-12 рядов в зонах пролиферации. В последних — ядра базального ряда эпителиоцитов крупные, хорошо окрашиваемые гематоксилином, в них встречаются фигуры митоза. Вышележащие клетки несколько меньших размеров, сохраняется округлая форма ядер, только в поверхностных 1-2 рядах клетки и их ядра несколько уплощены. Отдельные эпителиоциты 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 соединительными волокнами, складывающимися в пучки, и ориентированы параллельно друг другу. Среди волокон определяются немногочисленные сосуды капиллярного типа, стенка которых представлена умеренно ШИК-позитивной базальной мембраной и лежащими на ней эндотелиоцитами с несколько набухшей эозинофильной цитоплазмой и умеренно окрашиваемым гематоксилином уплощенным ядром. Периваскулярно определяются единичные клетки лимфоидного ряда. Часть сосудов с сужением или облитерацией просвета. (рис 2)



**Рис 2. Утолщение роговицы в зоне проведенной операции; очаговая гиперплазия переднего эпителия, пролиферация кератобластов в стенках сформированного кармана. Окраска гематоксилином и эозином. x200.**

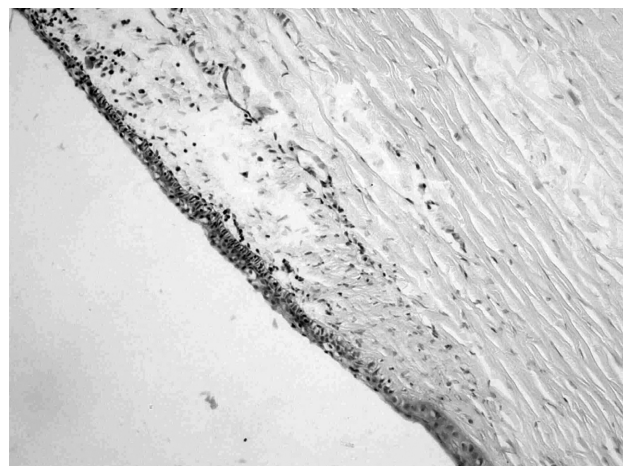
На 14 день после ЛКП трансплантата при микроскопическом исследовании поперечного среза глаза кроликов исследуемой группы роговица полностью эпителизирована, на всем протяжении и за исключением зоны лимба покрыта 4-5 рядами клеток с четкой дифференцировкой на слои. В области лимба в месте формирования лимбального кармана определяется очаг гиперплазии эпителия

до 6-7 рядов. По ходу сформированного кармана наблюдается увеличение количества кератобластов, расположенных между фуксинофильными соединительными волокнами, складывающимися в пучки, ориентированные параллельно друг другу и поверхности глаза. Пространства между пучками коллагеновых волокон расширены. Среди волокон определяются также немногочисленные сосуды капиллярного типа, стенка которых представлена умеренно ШИК-позитивной базальной мембраной и лежащими на ней эндотелиоцитами с несколько набухшим слабо базофильным ядром. Периваскулярно определяются клетки лимфоидного ряда. Часть сосудов — с частичной или полной облитерацией просвета. В дне лимбального кармана лежат пласты из тесно прилежащих друг к другу и расположенных в несколько рядов фибробластоподобных клеток. Они несколько вытянутой формы с ядром неправильной или несколько вытянутой формы, занимающим почти всю площадь клетки. Ядра со средней степенью дисперсности хроматина содержат 1-2 ядрышка, хорошо воспринимают основные красители. Часть клеток — с гиперхромными ядрами, фигурами митозов. Группы клеток аналогичного строения определяются также в вышележащих отделах собственного вещества и субэпителиальных отделах. В части наблюдений эпителий, прилежащий к участку гиперплазии, истончен до 2-3 рядов клеток. Базальные эпителиоциты со слабо базофильной цитоплазмой и округлым или овальным ядром, хорошо воспринимающим основные окраски, в части клеток определяются фигуры митоза. Вышележащие 1-2 ряда эпителиоцитов представлены плоскими клетками с уплощенными базофильными ядрами. Базальная мембрана переднего эпителия умеренно ШИК-позитивна, непрерывна, неравномерной толщины, несколько истончена в зоне гиперплазии. Под эпителием в поверхностных отделах лимба определяются тонкие слабо фуксинофильные волокнистые структуры, между которыми лежат растянутые тонкостенные кровеносные и лимфатические сосуды с очаговой десквамацией набухшего эндотелия, базальная мембрана эндотелия несколько утолщена, умеренно ШИК-позитивна. Параллельно лежащие вне зоны лимбального кармана соединительнотканые пластины собственного вещества роговицы слабо фуксинофильны, несколько набухшие, аморфное вещество слабо ШИК-позитивно. Пространства между пластинами несколько расширены. Между коллагеновыми волокнами определяются немногочисленные кератинобласты с округлым или вытянутым слабо базофильным ядром, единичные лимфоциты и макрофаги.

В группе контроля на 7 сутки после деэпителизации морфологически установлено нарушение дифференцировки роговичного эпителия, с нали-

чием нехарактерных для него бокаловидных клеток. Отмечается неровность поверхности роговицы, диффузная лимфогистиоцитарно-макрофагальная инфильтрация верхних отделов стромы. Неоваскуляризация.

На 14 сутки после деэпителизации отмечался конъюнктивальный паннус, деструкция базальной мембраны, с уменьшением полиморфноядерных лейкоцитов в поверхностных слоях стромы и увеличением количества фибробластов, что говорит об исчезновении воспаления. Также отмечается наличие новообразованных сосудов. (рис 3).



**Рис 3. Конъюнктивальный паннус в зоне лимба. Неровность поверхности роговицы, наличие бокаловидных клеток. (14 сутки) Бел. 2. 1. ГЭ 100**

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Благодаря эксперименту по созданию лимбальной недостаточности можно утверждать, что это состояние приводит к разрастанию на поверхности роговой оболочки клеток конъюнктивального эпителия (бокаловидных клеток), прорастанию сосудов и нарушению её прозрачности. А операция по фиксации культивированных клеток лимбального эпителия аутоотрансплантата в роговично-склерально-лимбальный карман восстанавливает полноценный эпителий на поверхности роговицы, за счет имплантированной культуры лимбальных клеток, группы которых обнаруживаются как в месте их имплантации, так и в субэпителиальных отделах роговицы. Локализация лимбальных клеток в поверхностных отделах роговицы объясняется, по нашему мнению, их способностью мигрировать к месту предшествующего повреждения эпителия.

Полученные данные клинико-морфологического исследования свидетельствуют как об успешном приживлении аутоотрансплантата, так и о положительной динамике регенераторного процесса, приводящего к нормальному функционированию переднего отдела глаза.

### ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований отмечена высокая пролиферативная активность эпителиоцитов лимба при их культивировании в эксперименте (количество клеток утроилось через  $(58,9 \pm 5,6)$  часов от начала культивирования с образованием монослоя,  $p < 0,0001^*$ ).

2. После лимбокератопломбирования ауто-трансплантата у животных с экспериментальной лимбальной недостаточностью выявлено отсутствие признаков конъюнктивизации роговой оболочки (помутнения и неоваскуляризации, на 7 и 14 сутки после операции,  $p < 0,0001^*$ ).

3. На 14 сутки после ЛКП в глазах животных с предварительно смоделированной лимбальной недостаточностью гистологически обнаружена полная эпителизация дефекта роговицы с четкой дифференцировкой переднего эпителия на слои, что говорит об эффективном влиянии ЛКП ауто-трансплантата на регенерацию роговического эпителия.

### 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 роговического 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. 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.
14. 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.
15. Kenyon K. R., Tseng S. C. G. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders // Ophthalmology. — 1989. — Vol. 96 — P. 709 — 723.
16. Kinoshita S., Koizumi N., Nakamura T. Transplantable cultivated epithelial sheet for ocular surface reconstruction // Exp. Eye research. — 2004. — Vol. 78 — P. 483 — 491.

Поступила 9.11.2009

Рецензент канд. мед. наук А. В. Артемов

### PECULIARITIES OF FORMATION OF THE CORNEAL EPITHELIUM AFTER TRANSPLANTATION OF THE AUTOGRAFT IN LIMBIC INSUFFICIENCY.

Bezdetko P. A., Iljina E. N., Naumova O. V., Mikulinskiy Yu. E., Panibrattseva S. G.

There were studied the peculiarities of restoration of the corneal epithelium after transplantation of the autograft in limbic insufficiency in the experiment. 10 chinchilla rabbits were operated on with the preliminarily modeled limbic insufficiency. The autograft on the fibrinous substrate was transplanted in the formed limbic pocket obtained from the contralateral healthy eyes of rabbits with subsequent cultivation under laboratory conditions. It allowed to avoid further development of conjunctivization of the cornea, to decrease (till complete disappearance) neovascularization and keratoleukoma, and to achieve total epithelization of the cornea defect with the clear differentiation of the front epithelium into the layers.

