

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

РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕРЕДНЕГО ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СУСПЕНЗИИ ЛИМБАЛЬНЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ IN VITRO 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»

Вивчалась регенерація поверхневого епітелію рогівки після пересадки суспензії культивованих in vitro аутологічних лімбальних клітин на експериментальній моделі часткової лімбальної недостатності. Було прооперовано 14 кроликів породи шиншилла, у яких на очі з попередньо змодельованою частковою лімбальною недостатністю під аутокон'юнктиву був пересаджений аутотрансплантат, взятий зі здорових очей тварин та лабораторно культивований. Це дозволило досягти повної епітелізації рогівкового дефекту з диференціацією переднього епітелію на шари.

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

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

Введение. Поверхность здорового глаза сформирована двумя типами эпителия — роговичным и конъюнктивальным. Передний эпителий роговицы является одной из важнейших структур, обеспечивающих гомеостаз роговой оболочки и глаза в целом. Соответственно и патологические процессы, развивающиеся при нарушении его целостности и адекватности регенераторных процессов в эпителии, многообразны.

Наиболее частыми проявлениями патологии эпителиального покрова глазного яблока являются кератиты, птеригиум, 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 наблюдаться при химическом или термическом ожоге легкой либо 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 процесса восстановления переднего эпителия роговицы (при лимбальной недостаточности) после трансплантации лимбальных клеток, в том числе, аутологичных. Это и явилось **целью нашего исследования.**

© П. А. Бездетко, Е. Н. Ильина, О. В. Наумова, Ю. Е. Микулинский, С. Г. Панибратцева, 2010

Проведено экспериментальное изучение характера приживления аутоотрансплантата в лимбальной области поражённого глаза после его пересадки и сроков восстановления роговичного дефекта с разработкой нового метода фиксации аутоотрансплантата. Проведены серии исследований, анализ которых представлен раздельно в сравнительном аспекте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Экспериментальное исследование выполнялось на 28 кроликах породы «шиншилла», массой 3–5 кг, 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) аутоотрансплантат пересаживался на лимбальную область повреждённого глаза с последующим покрытием аутоконъюнктивой. На глазу с частичной лимбальной недостаточностью, 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) аутоотрансплантата. В месте фиксации конъюнктивы к роговице с двух сторон были наложены два узловатых шва из виргинского нейлона 10/0.

Аутоотрансплантат получали 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 репарантами (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), степень прозрачности и васкуляризация роговицы.

Интенсивность помутнения роговицы оценивалась по четырехбалльной шкале [Куренков В. В., 1998г.]: 0 баллов — роговица прозрачна; 0.5 балла — 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 четырехбалльной шкале [Инатом Т., Япония, 2006]: 0 — отсутствие неоваскуляризации; 1 — периферическая васкуляризация (в области лимба); 2 — пери- и окололимбальная 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./ мм^2), $p < 0,001$.

В послеоперационном периоде наблюдалось спокойное течение — нагноения, потери трансплантата не отмечалось. 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 лизированного 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 недостоверны, $p > 0,05$.

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 наступала на ($2,9 \pm 0,1$) сутки. Аутоотрансплантат 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 напоздал на роговицу с периферии в виде вала. Частичная эпителизация отмечена на ($6,7 \pm 0,1$) сутки, различия достоверны, $p < 0,001$.

Полная эпителизация наступала 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 между средними показателями двух групп достоверны, $p < 0,001$.

На 14 сутки у экспериментальных кроликов глаза были спокойные, без воспалительных изменений. Наблюдалась полная эпителизация и резорбция трансплантата. Макроскопически врастания конъюнктивального эпителия на поверхность роговой оболочки не было отмечено. Роговица прозрачная гладкая блестящая, её поверхность ровная. В группе контроля неровная поверхность роговой оболочки, конъюнктивальный паннус.

Степень прозрачности в динамике представлена в таблице 1.

Таблица 1

Степень помутнения роговой оболочки у животных с экспериментальной лимбальной недостаточностью после конъюнктивальной иммобилизации ауто трансплантата 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		$p < 0,01$	$p < 0,001$

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 отражена в 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		$p < 0,001$	$p < 0,001$

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 ауто трансплантата. 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. Кератообласты 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 уплощенным ядром, умеренно окрашиваемым гематоксилином. 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 кератообласты и умеренно ШИК-позитивное аморфное вещество (рис. 1).

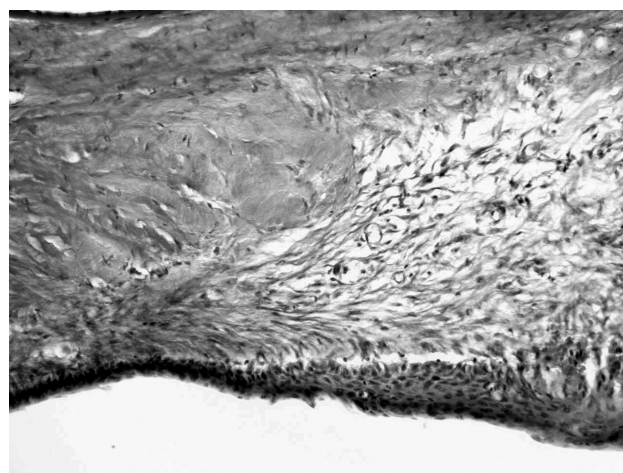


Рис. 1. Ауто трансплантат с намечающимся ламиллярным строением. В окружающей ткани пролиферация кератообластов, нежные коллагеновые волокна, формирующие пучковые структуры, новообразованные сосуды. Окраска пикрофуксином по ван Гизон. Ув. Ч100.

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

В контрольной группе животных на 7 сутки после деэпителизации (по Милюдину) морфологически было установлено нарушение дифференци-

ровки 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 аутотрансплантата, при микроскопическом изучении глаза в зоне лимба и прилегающих отделах 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 сосуды 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 запустевающие сосуды. Просветы сосудов были сужены (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 пластинками, состоящими из умеренно фуксинофильных коллагеновых волокон различной толщины, между которыми определялось умеренно ШИК-позитивное 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-позитивной 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.

численные 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-позитивной 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.

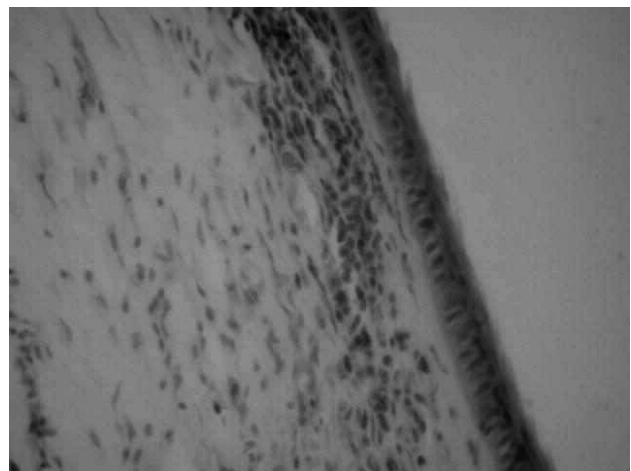


Рис. 2. Зона конъюнктивальной иммобилизации. Ровная поверхность роговицы с дифференцированным роговичным эпителием. Окраска гематоксилином и эозином. Ув x 200.

В контрольной группе животных на 14 сутки после деэпителизации (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.

Закключение. 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 ауто-трансплантата.

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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасименко В. Г. Биотехнология. — Киев: Вища 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. Миллюдин 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.

Поступила 21.06.2010

Рецензент канд. мед. наук А. В. Артемов

REGENERATION OF THE ANTERIOR CORNEAL EPITHELIUM AFTER TRANSPLANTATION OF THE LIMBIC CELL SUSPENSION *IN VITRO* ON THE MODEL OF THE PARTIAL LIMBIC INSUFFICIENCY

Bezdetko P. A., Ilyina E. N., Naumova O. V., Mikulinskiy Yu. E., Panibratseva S. G.

Kharkov, Ukraine

There was studied the regeneration of the superficial epithelium of the cornea after the transplantation of the suspension of the autologous limbic cells cultivated *in vitro* on the experimental model of partial limbic insufficiency. There were operated 14 chinchilla rabbits which were transplanted the autotransplant of the preliminarily modeled partial limbic insufficiency under the autoconjunctiva obtained from the eyes of healthy rabbits and laboratory cultivated. As a result of the surgery the total epithelization of the cornea defect began with the clear differentiation of the anterior epithelium into the layers.

