

УДК 617.713–002–02:616.523–06–039.35–07

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ ЛИМБА У БОЛЬНЫХ РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ГЕРПЕТИЧЕСКИМ КЕРАТИТОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ ЛИМБАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

П. А. Бездетко, проф., д-р. мед. наук, **Е. Н. Ильина**, аспирант,

Ю. Е. Микулинский, канд. биол. наук, **С. Г. Панибратцева**, мл. науч. сотр.,

Е. П. Мужичук, доцент, канд. мед. наук

Харьковский нац. мед. университет, лаборатория клеточных биотехнологий ХМАПО,
лаборатория молекулярной диагностики «Вирола»

Вивчалась проліферативна активність лімбальних епітеліоцитів у хворих на рецидивуючий герпетичний кератит, ускладнений лімбальною недостатністю. В 7 пацієнтів з герпетичною нейротрофічною кератопатією та в 7 пацієнтів зі стромальним метагерпетичним кератитом була проведена біопсія матеріалу із зони лімба обох очей (зі здорового ока та з ураженого вірусом простого герпесу ока). При культивуванні лімбальних епітеліоцитів людини виявлена їх висока проліферативна активність, як зі здорових так і із хворих очей. До культивування в пацієнтів із герпетичною нейротрофічною кератопатією було виділено 10502 клітини, зі здорових очей 10337, з очей хворих на стромальний метагерпетичний кератит 10563 клітини. При формуванні моношару (після 3 діб) кількість лімбальних епітеліоцитів однаково зростає в усіх випадках до 28973, 28491 та 29044 відповідно. Це дозволило судити про збереження проліферативної активності в уражених вірусом простого герпесу очей.

Ключевые слова: рецидивированный герпетический кератит, лимбальная недостаточность, пролиферация, лимбальные эпителиоциты.

Ключові слова: рецидивуючий герпетичний кератит, лімбальна недостатність, проліферація, лімбальні епітеліоцити.

Введение. Функциональная недостаточность поверхности глаза связана с дисфункцией эпителиального покрова разной степени выраженности, которая морфологически проявляется метаплазией клеток. Одним из таких нарушений является конъюнктивальная метаплазия роговицы, или лимбальная недостаточность [1, 5].

По степени выраженности выделяют частичную и тотальную лимбальную недостаточность. По патогенезу синдром лимбальной недостаточности (СЛН) может быть разделен на две большие группы [1, 2, 4]. Первый тип включает патологические состояния, обусловленные прямым разрушением лимбальных стволовых клеток. Второй тип данного синдрома вызван первичной деструкцией лимбальной стромы [5]. Он протекает по типу медленно прогрессирующего заболевания.

При длительном рецидивирующем течении герпетического кератита развиваются нейротрофические изменения, нарушающие метаболизм роговой оболочки. Это приводит к нарушению пролиферации стволовых роговичных клеток (которыми являются базальные эпителиоциты лимба)

и развитию рубцевания роговицы, истончению, неоваскуляризации, т.е. лимбальной недостаточности [1, 2, 5].

Характер течения рецидивирующего герпетического кератита, осложнённого лимбальной недостаточностью, изучен недостаточно. Необходимо уточнить, чем обусловлено развитие лимбальной недостаточности при рецидивирующем герпетическом кератите: неполноценностью субстрата стволовых клеток или самих стволовых клеток?

Именно это и определило актуальность темы и задачу нашего исследования.

Целью исследования было изучение пролиферативного потенциала лимбальных эпителиоцитов при рецидивирующем герпетическом кератите, осложнённом лимбальной недостаточностью.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. У 7 пациентов с односторонней герпетической нейротрофической кератопатией и у 7 пациентов с односторонним стромальным метагерпетическим кератитом, осложнённым лимбальной недоста-

точностью, в период ремиссии была произведена биопсия материала из зоны лимба обоих глаз (из здорового глаза и из поражённого *Herpes simplex* глаза).

До биопсии пациентам проводилось офтальмологическое обследование, которое включало: исследование зрительных функций, окрашивание роговой оболочки 0,2 % раствором флюоресцеина-натрия с последующей биомикроскопией, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию роговой оболочки, исследование чувствительности роговицы алгезиметром Радзиховского. Использовалась проба по Норну (оценка стабильности прероговичной слёзной плёнки). Исследования также включали постановку иммунологических реакций (ИФА, ПЦР).

Герпетическая нейротрофическая кератопатия была диагностирована на основании следующих признаков: наличие овального эпителиального дефекта роговицы с гладкими границами, с центральным расположением (в щели между веками), размерами $(5,2 \pm 0,2)$ мм на $(2,7 \pm 0,3)$ мм; отсутствие роговичной чувствительности $(0; 0,6 \pm 0,1; 0,9 \pm 0,2)$ воспринятых касаний альгезиметрами весом 2,0 мг; 10,0 мг; 50,0 мг соответственно; сокращение времени разрыва слёзной плёнки до $(5,6 \pm 0,3)$ с.

Стромальный метагерпетический кератит был диагностирован на основании следующих признаков: смешанной инъекции глазного яблока; снижения чувствительности роговицы до $0; 1,5 \pm 0,1; 3,0 \pm 0,2$ воспринятых касаний альгезиметрами 2,0; 10,0 мг и 50,0 мг соответственно; снижения стабильности слёзной плёнки до $6,8 \pm 0,4$ с; инфильтрации роговицы на фоне выраженного отёка, с изъязвлением; наличия роговичного дефекта площадью $(3,7 \pm 0,4)$ мм на $(3,6 \pm 0,1)$ мм, глубиной до 1/3 стромальной толщины, с периферическим расположением.

У всех пациентов наблюдались следующие признаки лимбальной недостаточности: конъюнктивальный паннус; снижение прозрачности роговицы; неоваскуляризация роговой оболочки; неровная поверхность роговой оболочки.

Биопсия производилась на 12 часах. Методом ламеллярной кератэктомии [4, 6] осуществлялся забор материала размерами 1×2 мм до 1/3 его толщины, после чего биоптат доставлялся в лабораторию в стерильной бакпечатке с 5 мл транспортной среды. Методики трипсинизации и культивирования выполнялись по прописям, изложенным в руководстве согласно методам культивирования клеток [3].

После удаления транспортной среды ткань инкубировали в 0,25 % растворе трипсина в течение 20 минут при 37°C . Трипсин затем удаляли, ткань ресуспендировали в среде DMEM и F12 (1:1) (Sigma, США) с 10 % фетальной бычьей сывороткой (Sigma, США) и 50 мкг/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 площадью 80 мм² и культивировали при 37°C и 5 % CO_2 в CO_2 -инкубаторе. Через 24 часа добавляли свежую среду и продолжали культивировать оставшиеся прикрепленными ко дну сосуда клетки еще сутки, до образования клеточного монослоя.

После культивирования 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. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева [3].

Для приготовления окрашенных препаратов культуру клеток промывали раствором Хэнкса, фиксировали метанолом и окрашивали по методу Романовского-Гимза прямо в культуральных чашках Петри. Для фиксации и окраски использовали набор «Leukodif», BIO-LA-TEST Laxema. Живые культуры и окрашенные препараты изучали и фотографировали с помощью инвертированного микроскопа (ЛОМО, Санкт-Петербург), светового микроскопа и цифровой видеокамеры Nikon D40x.

При математической обработке первичного материала были рассчитаны относительные величины, средние арифметические величины, их среднеквадратичное отклонение и ошибки средних величин. Достоверность различий показателей между группами оценивали с использованием критерия *t* (Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. При культивировании лимбальные клетки обладали выраженной адгезией и образовывали на дне культурального флакона колонии клеток полигональной формы с вытянутым ядром, занимающим 1/4 часть клетки. Ядра ориентированы апикально. Результаты количественного анализа культивированных лимбальных клеток представлены на рисунке 1.

До культивирования количество клеток, полученных из глаз пациентов с нейротрофической кератопатией, в среднем составило 10502 ± 428 , из глаз пациентов с стромальным метагерпетическим кератитом 10563 ± 614 , из здоровых глаз 10337 ± 444 . При сравнении средних значений данных показателей они не достоверны, $p > 0,05$.

Через 24 часа их количество достоверно увеличилось и составило 14827 ± 787 , 14977 ± 661 , 14951 ± 476 клеток соответственно. При сравнении средних значений показателей они также оказались не достоверны, $p > 0,05$.

Через $(71,4 \pm 1,4)$ часа образовался клеточный монослой. Количество клеток, полученных из глаз пациентов с нейротрофической кератопатией, в среднем составило 28973 ± 990 , из глаз пациентов с стромальным метагерпетическим кератитом 29044 ± 649 , из здоровых глаз 28491 ± 1210 , различия — не достоверны, $p > 0,05$.

Таким образом, при культивировании лимбальных эпителиоцитов человека обнаружена их одинаково высокая пролиферативная активность, причём как из поражённых ВПП, так и из здоровых глаз.

ВЫВОДЫ

1. При рецидивирующем герпетическом кератите развитие лимбальной недостаточности связано с нейротрофическими изменениями стромы.

2. Проллиферативная активность лимбальных эпителиоцитов при рецидивирующем герпетическом кератите сохранена.

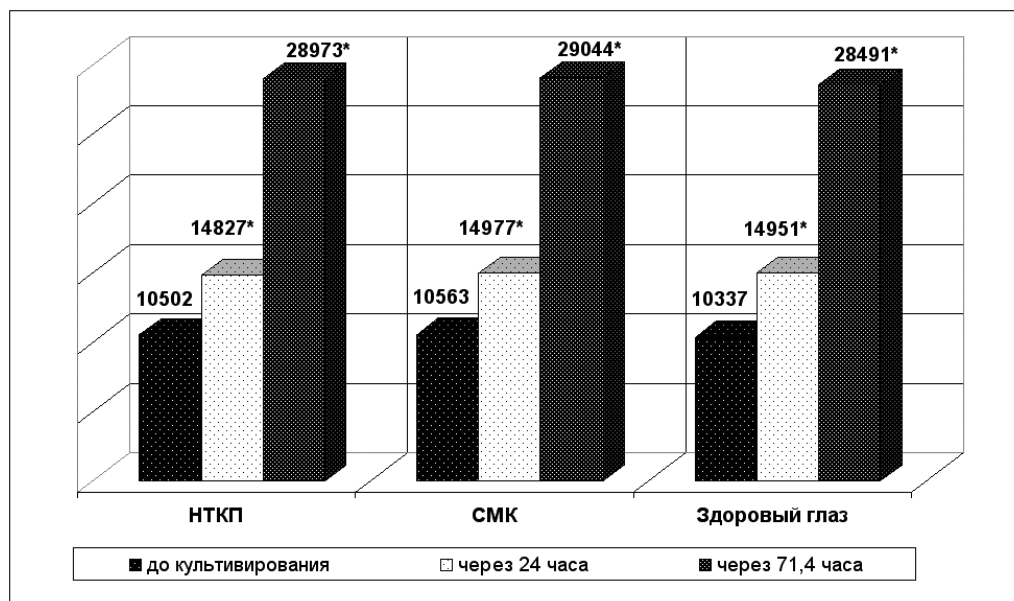


Рис. 1. Концентрация лимбальных клеток при культивировании у пациентов с герпетической нейротрофической кератопатией (НТКП) и стромальным метагерпетическим кератитом (СМК), осложнёнными лимбальной недостаточностью, из здоровых и поражённых глаз.

Примечание: * — уровень значимости различий среднего количества клеток лимба при их культивировании по отношению к среднему их значению до культивирования.

3. Проллиферативная активность эпителиоцитов лимба при герпетической нейротрофической кератопатии, стромальном метагерпетическом кератите и в здоровых глазах достоверно не отличается, что подтверждается образованием клеточного монослоя через 70 часов от начала культивирования и увеличением (за этот период) количества клеток с 10470 до 28840.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ситник Г. В. Современные клеточные биотехнологии в офтальмологии. Амниотическая мембрана как субстрат для культивирования стволовых эпителиальных клеток / Г. В. Ситник // Белорусский медицинский журнал. — 2005. — № 3. — С. 13–16.
2. Стволовые клетки и перспективы их применения в офтальмологии : материалы научно-практической конференции [«Регенеративная медицина и трансплантация тканей в офтальмологии»], (Москва, 16–17 марта 2005 г.) / М-во здравоохранения и соц. разви-

тия Российской Федерации, Моск. науч. — иссл. ин-т им. Гельмгольца. — М. : Моск. науч. — иссл. ин-т им. Гельмгольца, 2005. — С. 2–5.

3. Тартаковский А. Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих / Анатолий Дмитриевич Тартаковский. — Ленинград : Наука, 1988. — С. 44–46.
4. Chen J. J. Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium / J. J. Chen, S. C. Tseng // Invest. ophthalmol. vis. sci. — 1991. — Vol. 32. — P. 2219–2233.
5. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management / H. S. Dua, J. S. Saini, A. A. Azuara-Blanco, P. H. Gupta // Current. ophthalmology. — 2000. — Vol. 48. — P. 83–92.
6. Tseng S. C. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells / S. C. Tseng, M. N. Li, J. J. Chen // New england journal of medicine. — 2000. — Vol. 2 — P. 86–93.

Поступила 25.02.2011

Рецензент канд. мед. наук Т. Б. Гайдамака

THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF THE LIMBAL STEM CELLS IN PATIENTS WITH RECURRENT HERPETIC KERATITIS WITH THE STEM CELLS DEFICIENCY

P. A. Bezdetko, E. N. Plyina, Yu. E. Mikulinskiy, S. G. Panibratseva, E. P. Muzhichuk
Kharkov, Ukraine

The study was performed in 7 eyes with the recurrent stromal herpetic keratitis and the stem cell deficiency, in 7 eyes with herpetic neurotrophic keratopathy and in 7 healthy eyes. The limbal keratectomy was performed and after the cultivation of the limbal stem cells the proliferative activity was seen in all cases. Before cultivation 10502 cells were isolated from the eyes with herpetic neurotrophic keratopathy, 10337 cells from the healthy eyes and 10563 cells in eyes with the stromal metaherpetic keratitis. In formation of the monomolecular layer (in 3 days) the number of cells increased in all cases up to 28973, 28491 and 29044 accordingly.