

ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЛИМБАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ФИБРИНОВОМ СКАФФОЛДЕ

В. И. Михайлова¹, А. П. Понятовская², К. А. Александрова³, Е. Н. Батьков¹,
Н. А. Поздеева^{1,3}, И. В. Мухина^{2,4}

¹Чебоксарский филиал ФГАУ «НМИЦ "МНТК "Микрохирургия глаза» имени акад. С. Н. Федорова» Минздрава РФ, г. Чебоксары, Россия

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Н. Новгород, Россия

³ГАУ ДПО «Институт усовершенствования врачей» Минздрава Чувашии, г. Чебоксары, Россия

⁴ФГАУ ВО «Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского», г. Н. Новгород, Россия

FIRST RESULTS OF EXPERIMENTAL TRANSPLANTATION OF LIMBAL EPITHELIAL STEM CELLS ON FIBRIN SCAFFOLD

V. I. Mikhailova¹, A. P. Ponyatovskaya², K. A. Alexandrova³, E. N. Bat'kov¹,
N. A. Pozdeyeva^{1,3}, I. V. Mukhina^{2,4}

¹Cheboksary branch of the Academician S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Cheboksary, Russia

³Privolzhsky research medical university of the Ministry of health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia

²Institute of advanced medical training Ministry of health of Chuvashia, Cheboksary, Russia

⁴Lobachevsky University, Nizhny Novgorod, Russia

Резюме

Цель: разработать метод трансплантации культивированных лимбальных эпителиальных стволовых клеток на фибриновом скаффолде с использованием мягкой контактной линзы при лимбальной недостаточности.

Материалы и методы. После образования монослоя культивированные лимбальные эпителиальные стволовые клетки пересаживали на фибриновый скаффолд. Далее кролику с ранее созданной лимбальной недостаточностью была выполнена трансплантация культивированных лимбальных эпителиальных стволовых клеток на фибриновом скаффолде с применением мягкой контактной линзы.

Результаты. Наблюдалось восстановление роговичной поверхности через 8 дней после трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток, фибриновый скаффолд полностью резорбировался.

Заключение. Применение трансплантата культивированных лимбальных эпителиальных стволовых клеток на фибриновом скаффолде является перспективным методом для последующей успешной кератопластики на глазах с лимбальной недостаточностью (3 рис., 8 ист.).

Ключевые слова: лимбальная недостаточность, лимбальные эпителиальные стволовые клетки, фибриновый скаффолд.

Статья поступила в редакцию 03.07.2018 г.

Summary

Objective: is developing of method for transplanting cultured limbal epithelial stem cells on a fibrin scaffold with use of soft contact lens in case of limbal stem cells deficiency.

Materials and methods. The cultured limbal epithelial stem cells were transplanted on fibrin scaffold. Transplantation of cultivated limbal stem cells deficiency on a fibrin scaffold with use of soft contact lens was performed to rabbit with limbal stem cells deficiency.

Results of the study. The recovery of cornea was observed 8 days after limbal stem cells deficiency transplantation, the fibrin scaffold was completely resorbed.

The conclusion. The use of a transplant of cultured limbal cells on a fibrin scaffold is a promising method for the subsequent successful keratoplasty in case of limbal stem cells deficiency (3 figs, 8 refs).

Key words: limbal epithelial stem cells, limbal stem cells deficiency, fibrin scaffold.

Article received 03.07.2018.

ВВЕДЕНИЕ

Роговица является источником 3 типов стволовых клеток: лимбальных эпителиальных, стромальных и эндотелиальных. Лимбальные эпителиальные стволовые клетки (ЛЭСК) способны дифференцироваться в транзитные амплифицирующие клетки, которые отвечают за регенерацию роговичной поверхности [1].

Дефицит ЛЭСК приводит к дефектам эпителия, изъязвлению, васкуляризации роговицы, хроническому воспалению и образованию конъюнктивального паннуса [2]. Лимбальная недостаточность (ЛН) представляет собой серьезное препятствие на пути приживления трансплантата, значительно увеличивая риск реакции отторжения.

Вариантами хирургического лечения ЛН являются аутоотрансплантация лимба со здорового гла-

за, аллогенная трансплантация от доноров-трупов, трансплантация аутологичных культивированных лимбальных клеток. Каждый из этих методов применяется в зависимости от вида ЛН [3–7].

ЦЕЛЬ

Разработать метод трансплантации культивированных ЛЭСК на фибриновом скаффолде с использованием мягкой контактной линзы (МКЛ) при ЛН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с нормативами, указанными в руководстве «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (Institute for Laboratory Animal Research publication (Academy Press; 1996)), с национальным стандартом РФ ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», с этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). У взрослого кролика в условиях операционной под общей анестезией осуществляли забор лимбальной ткани. Выкраивали участок лимба протяженностью 10–12 мм, толщиной 200 мкм и шириной 2–3 мм. На парном глазу у кролика до трансплантации культивированных ЛЭСК был произведен щелочной ожог роговицы по методу Обенбергера аппликацией диска фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 8 мм), смачиваемой 2,5% раствором гидроксида натрия в течение 5 с. После ожога и забора лимбальной ткани проводились инстилляцией антисептических препаратов (пилоксидин 0,05% 4 раза в день), антибактериальных средств (левофлоксацин 0,5% 4 раза в день), корнеопротекторов (дексапантенол 5% 4 раза в день).

При посадке культуры использовали метод без предварительной ферментативной диссоциации. После образования клетками монослоя ЛЭСК снимали с поверхности пластика методом трипсинизации и пересаживали на биорезорбируемый носитель — скаффолд (рис. 1). Скаффолд формировали в виде полупрозрачной пленки из фибринового клея «Ивисел» (ООО «Джонсон и Джонсон», Россия). Клеточная культура после посадки на скаффолд прикреплялась к фибриновому клею и пролиферировала на нем, образуя монослой [8].

Далее под анестезией была выполнена трансплантация культивированных ЛЭСК на фибриновом



Рис. 1. Монослой клеток лимба на 13-е сут после перемещения тканевого биоптата на субстрат

скаффолде с применением силикон-гидрогелевой МКЛ с последующей блефарорафией. В послеоперационном периоде производились инстилляцией антисептических (пилоксидин 0,05% 4 раза в день) и антибактериальных средств (левофлоксацин 0,5% 4 раза в день). Через 1 нед сняты швы, удалена МКЛ. Проводили оценку изменения роговичной поверхности методом фоторегистрации, в том числе с применением флюоресцеина.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сразу после аппликации диска фильтровальной бумаги, смоченной 2,5% раствором гидроксида натрия, наблюдались помутнение роговицы по типу «матового стекла», отек роговицы, хемоз и смешанная инъекция конъюнктивы (рис. 2а). При окрашивании флюоресцеином определялся дефект роговичной поверхности (рис. 2б). Через 1 нед после ожога интенсивность помутнения роговицы уменьшилась, началось формирование новообразованных сосудов роговицы, отмечалась тенденция к эрозированию поверхности.

Скаффолд на основе фибринового клея позволил сформировать требуемую форму для лучшей адгезии трансплантируемой культуры к глазной поверхности, не отмечалось реакции иммунологического отторжения. Использование МКЛ способствовало правильному положению материала и предотвратило его смещение.

После снятия швов и удаления МКЛ наблюдалась полная резорбция фибринового клея; на роговице определялась эрозия размерами 2 × 2,5 мм, заэпителизовавшаяся на следующие сутки, а также центральное помутнение и новообразованные сосуды. В течение 4 нед после трансплантации ЛЭСК поверхность роговицы была полностью заэпителизована (рис. 3а), при окрашивании флюоресцеином тоже не было выявлено никаких дефектов (рис. 3б).

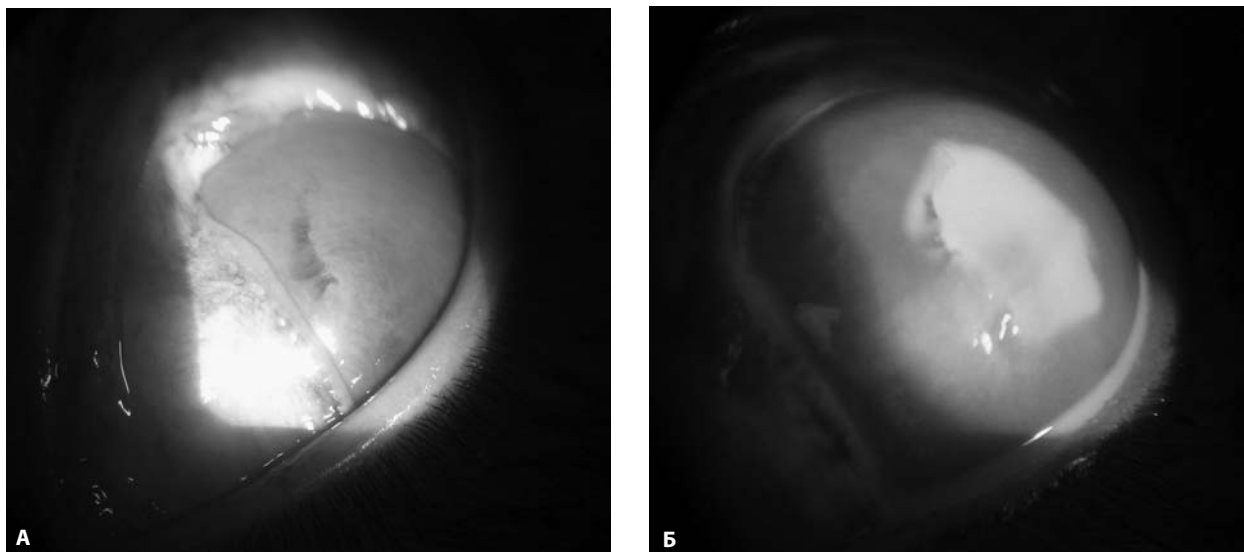


Рис. 2. Роговица кролика: а — на 3-и сут после химического ожога; б — на 3-и сут после химического ожога, окрашивание флюоресцеином

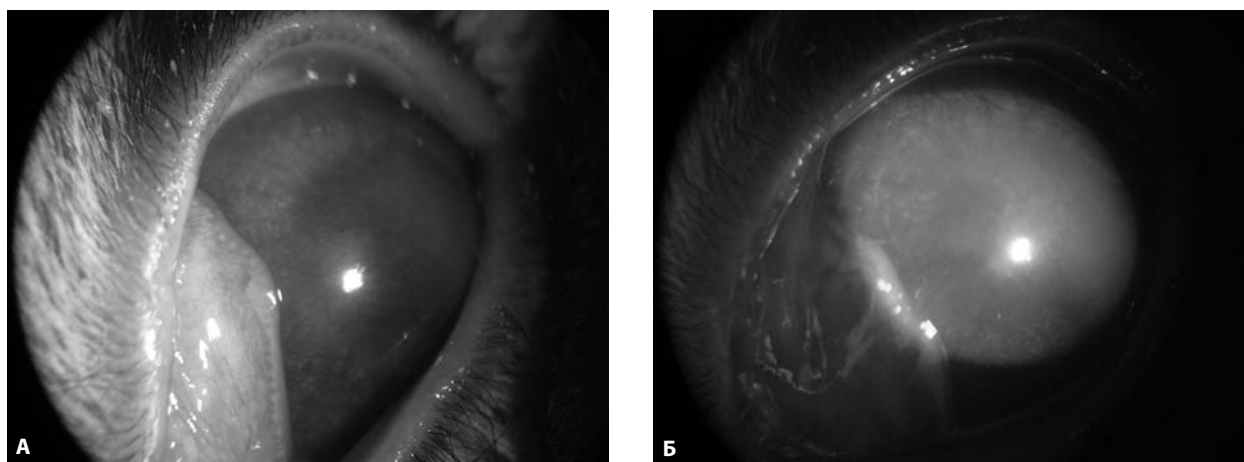


Рис. 3. Роговица кролика: а — через 4 нед после трансплантации ЛЭСК; б — через 4 нед после трансплантации ЛЭСК, окрашивание флюоресцеином

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фибриновый клей позволяет сформировать оптимальную форму скаффолда для лучшей адгезии трансплантируемой культуры к глазной поверхности, обладает свойствами биосовместимости и биodeградации, отсутствует иммунологическое отторжение. Применение трансплантата культивиро-

ванных ЛЭСК позволило восстановить роговичную поверхность на 8-й день после трансплантации. Описанная технология трансплантации ЛЭСК на фибриновом клее является перспективным методом восполнения пула ЛЭСК перед кератопластикой у пациентов с ЛН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Nieto-Miguel T., Calonge M., de la Mata A., López-Paniagua M., Galindo S., de la Paz M. F., Corrales R. M. A comparison of stem cell-related gene expression in the progenitor-rich limbal epithelium and the differentiating central corneal epithelium. *Molecular Vision*. 2011; 17: 2102–17.
2. Dua H. S., Saini J. S., Azuara-Blanco A., Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2000; 48: 83–92.
3. Sangwan V. S., Basu S., Vemuganti G. K., Sejpal K., Subramaniam S. V., Bandyopadhyay S., Krishnaiah S., Gaddipati S., Tiwari S., Balasubramanian D. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. *British Journal of Ophthalmology*. 2011; 95: 1525–9.
4. Baradaran-Rafii A., Ebrahimi M., Kanavi M. R., Taghi-Abadi E., Aghdami N., Eslani M., Bakhtiari P., Einollahi B., Baharvand H., Javadi M. A. Midterm outcomes of autologous cultivated limbal stem cell transplantation with or without penetrating keratoplasty. *Cornea*. 2010; 29 (5): 502–9.
5. Sejpal K., Ali M. H., Maddileti S., Basu S., Ramappa M., Kekunnaya R., Vemuganti G. K., Sangwan V. S. Cultivated

Limbal Epithelial Transplantation in Children With Ocular Surface Burns. JAMA Ophthalmology. 2013; 131 (6): 731–6.

6. Pauklin M., Fuchsluger T. A., Westekemper H., Steuhl K.-P., Meller D. Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency. Developments of Ophthalmology. 2010; 45: 57–70.

7. Hynds R. E., Bonfanti P., Janes S. M. Regenerating human epithelia with cultured stem cells: feeder cells, organoids and beyond. EMBO Molecular Medicine. 2018; 10 (2): 139–50.

8. Ponyatovskaya A. P., Korotchenko S. A., Davydenko D. V., Yudin A. V., Mikhailova V. I., Shipunov A. A., Nikolaev I. A., Pozdeeva N. A., Bat'kov E. N., Mukhina I. V. Transplant of Limbal Epithelial Stem Cells on Bioresorbable Scaffold. Sovremennye tekhnologii v meditsine 2017; 9 (4): 44–50. (Russian) (Понятовская А. П., Коротченко С. А., Давыденко Д. В., Юдинцев А. В., Михайлова В. И., Шипунов А. А., Николаев И. А., Поздеева Н. А., Батьков Е. Н., Мухина И. В. Трансплантат лимбальных эпителиальных стволовых клеток на биорезорбируемом носителе. Современные технологии в медицине. 2017; 9 (4): 44–50).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Михайлова Валентина Ивановна — врач-офтальмолог, Чебоксарский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С. Н. Федорова», 428028, Россия, г. Чебоксары, пр. Тракторостроителей, д. 10, конт. тел.: 8(8352)520575, e-mail: valmiha@rambler.ru

Понятовская Анастасия Петровна — инженер-исследователь, ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, 603005, Россия, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1, конт. тел.: 8(831)4654281, e-mail: ponyatovskaya@inbox.ru

Александрова Ксения Андреевна — врач-ординатор, ГАУ ДПО «Институт усовершенствования врачей» Минздрава Чувашии, 428018, Россия, г. Чебоксары, ул. Михаила Сеспеля, д. 27, конт. тел.: 8(8352)520575, e-mail: a-ksusha93@mail.ru

Батьков Евгений Николаевич — канд. мед. наук, заместитель директора по организационно-клинической работе, Чебоксарский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С. Н. Федорова», 428028, Россия, г. Чебоксары, пр. Тракторостроителей, д. 10, конт. тел.: 8(8352)492616, e-mail: ybatkov@yandex.ru

Поздеева Надежда Александровна — докт. мед. наук, заместитель директора по научной работе, Чебоксарский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С. Н. Федорова», 428028, Россия, г. Чебоксары, пр. Тракторостроителей, д. 10, профессор курса офтальмологии ГАУ ДПО «Институт усовершенствования врачей» Минздрава Чувашии, 428018, Россия, г. Чебоксары, ул. Михаила Сеспеля, д. 27, конт. тел.: 8(8352)364696, e-mail: npozdeeva@mail.ru

Мухина Ирина Васильевна — докт. наук, профессор, заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией, кафедра нормальной физиологии имени Н. Ю. Беленкова, ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, 603005, Россия, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1, профессор кафедры нейротехнологий, ФГАУ ВО «Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского», 603950, Россия, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, кор. 1, конт. тел.: 8(831)4654333, e-mail: mukhinaiv@mail.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Mikhailova Valentina I. — M. D., Ophthalmologist, Cheboksary branch of the Academician S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, 10, Traktostroiteley av., Cheboksary, Russia, 428028, cont. phone: 8(8352)520575, e-mail: valmiha@rambler.ru

Ponyatovskaya Anastasiya P. — Engineer-Researcher, Privolzhsky research medical university of the Ministry of health of the Russian Federation, 10/1, Minin and Pozharsky square, Nizhny Novgorod, Russia, 603005, cont. phone: 8(831)4654281, e-mail: ponyatovskaya@inbox.ru

Aleksandrova Kseniya A. — M. D., Physician-in-Residency, Institute of advanced medical training Ministry of health of Chuvashia, 27, Mikhaila Sespelya str., Cheboksary, Russia, 428018, cont. phone: 8(8352)520575, e-mail: a-ksusha93@mail.ru

Bat'kov Evgeniy N. — M. D., Ph. D. (Medicine), Deputy Clinical Director, Cheboksary branch of the Academician S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, 10, Traktostroiteley av., Cheboksary, Russia, 428028, cont. phone: 8(8352)492616, e-mail: ybatkov@yandex.ru

Pozdeyeva Nadezhda A. — M. D., D. Sc. (Medicine), Deputy Director of Research Work, Cheboksary branch of the Academician S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, 10, Traktostroiteley av., Cheboksary, Russia, 428028, Professor of Ophthalmology course of Institute of advanced medical training Ministry of health of Chuvashia, 27, Mikhaila Sespelya str., Cheboksary, Russia, 428018, cont. phone: 8(8352)364696, e-mail: npozdeeva@mail.ru

Mukhina Irina V. — M. D., D. Sc. (Medicine), Professor, the Head of the Belenkov normal physiology Department, Privolzhsky research medical university of the Ministry of health of the Russian Federation, 10/1, Minin and Pozharsky square, Nizhny Novgorod, Russia, 603005, professor of neurotechnology department, Lobachevsky University, 23/1, Gagarina av., Nizhny Novgorod, Russia, 603950, cont. phone: 8(831)4654333, e-mail: mukhinaiv@mail.ru