

ISSN 2072-1757 (print)

ISSN 2307-3217 (online)

Научно-практический медицинский журнал

# ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА



# PRACTICAL MEDICINE

The scientific and practical medical journal

Офтальмология

Ophthalmology

16+

№ 3 (104)' 2017

WWW.PMARCHIVE.RU

WWW.MFVT.RU

## ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИОННЫХ РАБОТ

УДК 617.713:576.32/36

**В.И. МИХАЙЛОВА, Н.А. ПОЗДЕЕВА, Е.Н. БАТЬКОВ, А.А. ШИПУНОВ**

Чебоксарский филиал ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, 428028, г. Чебоксары, пр. Тракторостроителей, д. 10

# **Лимбальные эпителиальные стволовые клетки, методы их культивирования и трансплантации при лечении лимбальной недостаточности**

**Валентина Ивановна Михайлова** – врач-офтальмолог, тел. (8352) 49–26–61, e-mail: valmiha@rambler.ru

**Надежда Александровна Поздеева** – доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе, тел. (8352) 36–46–96, e-mail: prozdeeva@mail.ru

**Евгений Николаевич Батьков** – кандидат медицинских наук, заместитель директора по организационно-клинической работе, тел. (8352) 49–25–88, e-mail: ybatkov@yandex.ru

**Александр Александрович Шипунов** – младший научный сотрудник, тел. (8352) 49–24–11, e-mail: sashawoody@mail.ru

Лимбальная недостаточность является одной из ключевых причин развития васкуляризованных помутнений роговицы. Неэффективность хирургического лечения в данных случаях чаще всего обусловлена дисфункцией или недостаточностью лимбальных эпителиальных стволовых клеток. В обзоре представлены существующие современные методы культивирования и трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток.

**Ключевые слова:** лимбальные эпителиальные стволовые клетки, недостаточность лимбальных стволовых клеток, культивирование клеток.

**V.I. MIKHAYLOVA, N.A. POZDEYEVA, E.N. BATKOV, A.A. SHIPUNOV**

Cheboksary branch of the S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, 10 Traktorostroiteley Pr., Cheboksary, Russian Federation, 428028

# **Limbial epithelial stem cells, methods of cultivation and transplantation in case of limbal stem cells deficiency**

**Mikhaylova V.I.** – ophthalmologist, tel. (8352) 49–26–61, e-mail: valmiha@rambler.ru

**Pozdeeva N.A.** – D. Med. Sc., Deputy Director of Research Work, tel. (8352) 36–46–96, e-mail: npozdeeva@mail.ru

**Batkov E.N.** – Cand. Med. Sc., Deputy Clinical Director, tel. (8352) 49–25–88, e-mail: ybatkov@yandex.ru

**Shipunov A.A.** – Junior Researcher, tel. (8352) 49–24–11, e-mail: sashawoody@mail.ru

*Limbal stem cells deficiency is one of the most common causes of vascularized corneal opacities. The ineffectiveness of surgical treatment is associated with dysfunction or insufficiency of limbal epithelial stem cells in most cases. The article presents the existing modern methods of cultivation and transplantation of limbal epithelial stem cells.*

**Key words:** *limbal epithelial stem cells, limbal stem cells deficiency, cell cultivation.*

Количество людей с нарушением зрения, причиной которых являются помутнения роговицы, во всем мире, по данным ВОЗ, составляет 2,46 мил-

лиона, из них слепых – 1,56 миллиона. Одной из основных причин помутнений роговицы является лимбальная недостаточность, развивающаяся

вследствие химических или термических ожогов, а также ряда наследственных заболеваний, включая врожденную аниридию.

Лимбальные палисады и лимбальные эпителиальные стволовые клетки

В 1866 г. Henle G.J открыл лимбальные палисады, а в 1921 г. Vogt A. подробно их описал. Через несколько лет Aurell G. и Kornerup T. предположили, что палисады Фогта являютсяrudиментарными слезными железами, в 1971 г. Davanger M. и Evensen A. установили связь с процессами регенерации эпителия роговицы.

Лимбальные палисады Фогта (ЛПФ) представляют собой ряд фиброкскулярных трабекул, радиально ориентированных к центру роговицы и располагающихся периферичнее капиллярной сети роговицы и центральнее шлеммова канала [1]. Пространство между трабекулами называется межпалисадным пространством и содержит роговичный эпителий на разной стадии дифференцировки, ЛЭСК, меланоциты, клетки Лангерганса и супрессорные Т-лимфоциты. Трабекулы содержат кровеносные и лимфатические сосуды и нервы, которые также ориентированы радиально к роговице.

В ЛПФ находится особый пул стволовых клеток – лимбальные эпителиальные стволовые клетки. В 1971 г. M. Davanger и A. Evansen предположили, что эпителий лимба является источником стволовых клеток для роговицы, что в последующем было подтверждено в эксперименте и клинике. N. Polisetty et al. в 1998 г. доказали присутствие ЛЭСК в палисадах Фогта.

ЛЭСК находятся в определенном микроокружении, которое регулирует их цикл, чтобы сохранить клетки в недифференцированном состоянии и модулирует их функцию посредством внутренних и внешних факторов. ЛЭСК защищены от УФ-излучения меланоцитами, которые находятся в базальных слоях лимбального эпителия, а также верхнего и нижнего веков. Волнообразная базальная мембрана защищает ЛЭСК от силы сдвига, а лимбальные стромальные кровеносные сосуды и мезенхимальные клетки снабжают ее кислородом, цитокинами, факторами роста и другими питательными веществами. Деление ЛЭСК происходит асимметричным способом, при котором одна дочерняя клетка позволяет поддерживать «стволовость» и сохранять пул стволовых клеток, а другая становится транзиторной амплифицирующейся клеткой, которая далее может дифференцироваться в крыловидные клетки, которые затем в свою очередь трансформируются в терминально дифференцированные роговичные эпителиальные клетки [1-3].

Регенерация поверхности роговицы после повреждения эпителия связана с делением, миграцией и созреванием ЛЭСК. Некоторые авторы описывают движение клеток при эпителизации вначале как циркумференциальные, встречающиеся между собой вдоль лимба, а затем мигрирующие центростремительно для закрытия центрального дефекта [1].

#### Маркеры ЛЭСК

Был проведен ряд исследований для изучения специфических маркеров ЛЭСК. Было предложено несколько маркеров, включая: ферменты, такие как α-енолаза, цитохромоксидаза, карбоангидраза; рецепторы фактора роста, такие как рецептор эпидермального фактора роста (EGF) и трансформирующий рецептор I и II фактора роста β (TGF- β); медиаторы клеточного цикла, такие как циклины D

и E и ABCB5 и ABCG2; транскрипционный фактор ΔNp63 [1, 4-7]. Однако консенсуса относительно конкретного маркера для ЛЭСК нет.

Установлено, что ЛЭСК экспрессируют цитокератины K5 / K14, как и большинство недифференцированных клеток эпителия, но лишены маркеров K3 / K12, характерных для дифференцированных клеток роговицы [8, 9].

Цитокератин K3 является маркером терминальной дифференцировки эпителия роговицы [10]. Он окрашивает все дифференцированные клетки роговичного и лимбального эпителия, но не конъюнктивального эпителия. Цитокератин K19 присутствует во всех конъюнктивальных и лимбальных эпителиальных клетках, а также в периферических базальных клетках роговицы.

Таким образом, экспрессия предполагаемых маркеров стволовых клеток и отсутствие маркеров дифференцировки (K3 / K12), явилась альтернативной стратегией идентификации ЛЭСК.

Кроме того, была выявлена положительная корреляция между процентом p63-положительных клеток в трансплантате и степенью успеха трансплантации ЛЭСК [4, 11]. Культуры, содержащие более 3% p63-положительных стволовых клеток, были связаны с успешной трансплантацией у 78% пациентов. Это может стать новым критерием для оценки качества культуры стволовых клеток.

Культивирование и трансплантация ЛЭСК при лимбальной недостаточности

Было установлено, что потеря ЛЭСК или их дисфункция приводят к развитию неоваскуляризации, стойкими дефектами эпителия, хроническим воспалением [12].

Недостаточность ЛЭСК может быть как первичной, в т.ч. при аниридии, нейротрофическом кератите, так и вторичной, связанной с внешними факторами (при термических или химических повреждениях, синдроме Стивена-Джонсона, ношении контактных линз) [13].

Диагностика лимбальной недостаточности играет значительную роль, т.к. пациенты с данной патологией являются плохими кандидатами для обычной кератопластики, поскольку трансплантированные эпителиальные клетки имеют ограниченную пролиферативную способность и продолжительность жизни.

Существуют различные варианты патогенетического лечения лимбальной недостаточности с помощью стволовых клеток в зависимости от ее типа (полная или частичная, врожденная или приобретенная) [14]:

1) аутотрансплантаты лимба со здорового глаза или от близких родственников. Недостатком метода является вероятность развития лимбальной недостаточности на ранее интактном глазном яблоке; также данный метод невозможно использовать при двухстороннем поражении и при наследственных генетических заболеваниях [15]. У пациентов с односторонней тотальной лимбальной недостаточностью рекомендуется лимбальная аутотрансплантация: считается, что риск возникновения осложнений со стороны роговицы в донорском глазу низкий, когда удаляются сегменты лимбальной ткани протяженностью менее четырех-шести часов условного циферблата.

2) трансплантаты аллогенного лимба от доноров-трупов. Данный метод используется при двухсторонней тотальной лимбальной недостаточности. Основным недостатком метода является длитель-

ная иммуносупрессивная терапия. В лимбальных аллотрансплантатах нарушение эпителиальной поверхности может повторяться, если существует иммунологическое разрушение трансплантированных ЛЭСК. Высокую частоту иммунных реакций можно ожидать из-за иммуногенного стимула лимбальной трансплантации, связанного с относительным количеством клеток Лангерганса и антигенами HLA-DR. Если живые родственники являются потенциальными донорами, предпочтительной является ткань, совпадающая по системе HLA [14].

3) аутологичные лимбальные клетки, культивированные на различных носителях (амниотическая мембрана, коллагеновый скаффолд и др.). Применение данного способа ограничено технической сложностью и стоимостью; также разработанные на сегодняшний день способы культивирования и трансплантации не обеспечивают стойкой регенерации роговичного эпителия и не всегда позволяют получить достаточно длительное поддержание регенераторных свойств роговичного эпителия для успешного выполнения пересадки роговицы.

Процедуры трансплантации также варьируются в зависимости от ткани, используемой для перемещения ЛЭСК: используется конъюнктива (конъюнктивальный лимбальный трансплантат), роговица (кератолимбальный трансплантат) или склеры (склеролимбальный трансплантат) в качестве ткани-носителя для лимбальных стволовых клеток [3].

Метод трансплантации ЛЭСК был впервые предложен Кенуоп K.R. и Tseng S.C. в 1989 г. Впоследствии эффективность данного метода в лечении частичной либо тотальной односторонней ЛН была подтверждена и другими исследователями. Трансплантация культивируемого лимбального эпителия в настоящее время является наиболее успешной альтернативой восстановлению поверхности у пациентов с односторонней лимбальной недостаточностью и предоставляет шанс пациентам с тяжелым двусторонним поражением лимба [16].

В настоящее время существуют различные модели культивирования ЛЭСК.

В настоящее время большинство исследователей предпочитают метод культивирования эксплантов вместо клеточной супензии. Преимущества использования эксплантов заключаются в том, что их легко подготовить и нет опасности повреждения эпителия роговицы путем обработки ферментами.

Общие принципы культивирования клеток методом экспланационной культуры включают в себя следующие этапы: сбор лимбальной ткани (от централатерального здорового глаза в случае односторонней лимбальной недостаточности или от донорской роговицы при двусторонней лимбальной недостаточности); выбор подходящего скаффолда: многослойный эпителий, амниотическая мембрана человека (интактная или деэпителизованная), коллагеновые скаффолды или контактные линзы; подготовка эпителиальной среды роговицы человека; экспланационная культура [17-19].

Подтверждение роста может быть осуществлено различными методами, включая прямое наблюдение, препарат с полным окрашиванием, гистопатологию, иммуногистохимию, проточную цитометрию с использованием маркеров для клеточного цикла.

Экспериментальными исследованиями было доказано, что для длительного культивирования и размножения различных типов эпителиальных клеток необходимо наличие питательной среды либо субстрата, присутствие фибробластов, а также до-

статочное количество факторов роста и цитокинов.

Система для культивирования, содержащая фибробlastы и сокращенно называемая ЗТЗ-система, была применена для выращивания эпителиальных клеток поверхности глаза кролика и человека. При изучении клонированных лимбальных эпителиальных клеток было обнаружено, что они успешно консервируются в ЗТЗ-системе.

В дальнейшем изучалась возможность применения других субстратов, таких как гидрогель, покрытый фибронектином, коллагеновые матрицы, фибрин и т.д., для культивирования эпителия *ex vivo*. Rama P. et al. в 2001 г. использовали фибриновый субстрат для культивирования лимбальных эпителиальных клеток, взятых с централатерального здорового глаза, что привело к хорошему результату – эпителизации в течение первой недели.

В четырех клинических исследованиях сообщалось об использовании фибрина в качестве субстрата для трансплантации ЛЭСК [11, 21-23]. В исследованиях на животных обнаружено, что фибриновые гели полностью деградировали через 3 дня. После деградации геля трансплантированные клетки прикреплялись непосредственно к строме роговицы. В начале 2015 года был условно одобрен Holoclar для выпуска в Италии в качестве первой коммерчески доступной терапии стволовыми клетками для лечения лимбальной недостаточности. Существующие данные о Holoclar были получены ретроспективным наблюдением пациентов, и ежегодное обновление одобрения будет руководствоваться результатами текущего многоцентрового, предполагаемого клинического испытания фазы IV. Тем не менее, практическое использование этого лекарственного продукта на основе фибрина ограничивается аутологичной трансплантацией стволовых клеток в односторонних случаях после химического или термического ожога.

Что касается результатов, то сообщаемые результаты долгосрочных наблюдений (1,5-10 лет) варьируются, причем стабильное восстановление роговичной поверхности варьируется от 47% до 100%. Такой разброс может быть обусловлен недостаточным предшествующим лечением перед трансплантацией или характером основного процесса: например, аутоиммune заболевания, как правило, характеризуются постоянными рецидивами воспалительного процесса, приводящие к выраженному синдрому «сухого глаза» и вызывающие болезнь трансплантата.

Альтернативным источником получения эпителиальных клеток для лечения лимбальной недостаточности могут быть мезенхимальные стволовые клетки, стволовые клетки из волосяного фолликула и эпителиальные клетки из слизистой [13, 22].

Таким образом, в настоящее время нет единого подхода к лечению лимбальной недостаточности, каждый метод культивирования и трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток позволяет добиться улучшения остроты зрения и восстановления роговичной поверхности, имеет свои ограничения и преимущества.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. T. Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis //World Journal of Stem Cells.— 2014. — Vol.6, №4.— P. 391–403.
2. Фримен Д.М. Ассоциированная с аниридией кератопатия // Практическая медицина. — 2015. — Т.1, №2 (87). — С. 62-69.
3. Гундорова Р.А., Макаров П.В., Терских В.В. и др. Перспективы применения новых биотехнологических методов в регуляции регенерации роговицы // Вестник офтальмологии. — 2004. —

- №6. — С. 49–52.
4. H. S. Epithelial cell characteristics of cultured human limbal explants // S. et al. A comparison of stem cell-related gene expression in the progenitor-rich limbal epithelium and the differentiating central corneal epithelium // Molecular Vision. — 2011. — Vol.17. — P. 2102–2117.
  5. Ksander B.R., Kolovou P.E., Wilson B.J. et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair // Nature. — 2014. — Vol.511, 7509. — P.353–357.
  6. De Paiva C.S., Chen Z., Corrales R.M. et al. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells // Stem Cells. — 2005. — Vol.23. — P. 63–73.
  7. Kurpaku M.A., Maniaci M.T., Esco M. Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium // Current Eye Research. — 1994. — Vol.13, №11. — P. 805–814.
  8. Yoshida S., Shimmura S., Kawakita T., et al. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces // Investigative Ophthalmology & Visual Science. — 2006. — Vol.47, №11. — P. 4780–4786.
  9. Kawashima M., Kawakita T., Satake Y. et al. Phenotypic study after cultivated limbal epithelial transplantation for limbal stem cell deficiency // Archives of Ophthalmology. — 2007. — Vol.125, №10. — P. 1337–1344.
  10. Rama P., Matuska S., Paganoni G. et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration // The New England Journal of Medicine. — 2010. — 363(2). P. 147–155.
  11. Shortt A.J., Bunce C., Levis H.J., et al. Three-year outcomes of cultured limbal epithelial allografts in aniridia and Stevens-Johnson syndrome evaluated using the clinical outcome assessment in surgical trials assessment tool // Stem Cells Translation Medicine. — 2014. — 3(2). P. 265–275.
  12. Кузьменко В.В., Ступникова Т.В., Хейфец Ю.Б., Вавилова Л.М. Применение стволовых клеток в офтальмологии // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2015. — №4(13). — С.128–133.
  13. V. Cultivated limbal stem cell transplantation for ocular surface reconstruction // Clinical Ophthalmology. — 2008. — 2(3). P. 489–502.
  14. Поздеева Н.А., Тонаева Х.Д., Борзенок С.А. Аллолимбальная трансплантация в лечении пациентов с недостаточностью лимбальных стволовых клеток при врожденной аниридии // Медицинский альманах. — 2014. — №1 (31). — С. 74–77.
  15. Sangwan V.S., Basu S., Vemuganti G.K., et al. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study // British Journal of Ophthalmology. — 2011. — Vol.95, №11. — P. 1525–1529.
  16. Пасечникова Н.В., Гринь В.К., Дрожжина Г.И и др. Полу-ченение трехмерного трансплантата лимбальных клеток роговицы // Вестник неотложной и восстановительной медицины. — 2012. — Т. 13, №1. — С. 99–102.
  17. Попандопуло А.Г., Кавелина А.С., Иванова О.Н., Дрожжина Г.И. Роль лимбальных клеток в регенерации роговицы // Таврический медико-биологический вестник. — 2013. — Т.16, №1, 4.2 (61). — С.158–160.
  18. Haagdorens M., Van Acker S. I., Van GerwenV. et al. Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies // Stem Cells International.— 2016. Published online 2015 Dec. 14.
  19. Baradaran-Rafii A., Ebrahimi M., Kanavi M.R. et al. Midterm outcomes of autologous cultivated limbal stem cell transplantation with or without penetrating keratoplasty // Cornea.—2010. — Vol.29, №5. — P. 502–509.
  20. Rama P., Bonini S., Lambiase A., Golisano O. et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency // Transplantation. — 2001. — Vol.72, №9. — P. 1478–1485.
  21. Gisoldi R. A. M. C., Pocobelli A., Villani C. M. et al. Evaluation of molecular markers in corneal regeneration by means of autologous cultures of limbal cells and keratoplasty // Cornea. — 2010. — Vol.29, 7. — P. 715–722.
  22. Di Iorio E., Ferrari S., Fasolo A. et al. Techniques for culture and assessment of limbal stem cell grafts // Ocular Surface. — 2010. — Vol.8, №3. — P. 146–153.
  23. Pellegrini G., Rama P., Matuska S. et al. Biological parameters determining the clinical outcome of autologous cultures of limbal stem cells // Regenerative Medicine. — 2013. — Vol.8, №5. — P. 553–567.
  24. Sejpal K., Ali M.H., Maddileti S., et al. Cultivated limbal epithelial transplantation in children with ocular surface burns // JAMA Ophthalmology. — 2013. — Vol.131, №6. — P. 731–736.
  25. Pauklin M., Fuchsluger T.A., Westekemper H., et al. Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency // Developments of Ophthalmology. — 2010. — Vol.45. — P. 57–70.
  26. Basu S., Ali H., Sangwan V.S. Clinical outcomes of repeat autologous cultivated limbal epithelial transplantation for ocular surface burns // American Journal of Ophthalmology. — 2012. — Vol.153, №4. — P. 643–650.
  27. Daya S.M., Watson A., Sharpe J.R. et al. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction // Ophthalmology. — 2005. — Vol.112, №3. — P.470–477.
  28. Sangwan V.S., Matalia H.P., Vemuganti G.K. et al. Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation // Indian Journal of Ophthalmology. — 2006. — Vol.54. — P. 29–34.