Источник

Современные технологии в офтальмологии № 4 2019

Актуальные проблемы офтальмологии

Реферат RUS Реферат ENG Литература Полный текст

УДК:

DOI: https://doi.org/10.25276/2312-4911-2019-4-178-180

Михайлова В.И., Александрова К.А., Поздеева Н.А., Батьков Е.Н., Понятовская А.П., Мухина И.В.

Сравнительное исследование трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток на фибриновом скаффолде при лимбальной недостаточности у экспериментальных животных

[1]Чебоксарский филиал «НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ
[2]Институт усовершенствования врачей Минздрава Чувашии
[3]"Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации
[4]Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского

Актуальность

Лимбальные эпителиальные стволовые клетки (ЛЭСК), расположенные в зоне палисадов Фогта в области базального эпителия лимба, обеспечивают нормальное функционирование роговичного эпителия. В норме самообновление эпителия роговицы происходит каждые 5-7 дней. Потеря или дисфункция ЛЭСК ведет к возникновению лимбальной недостаточности (ЛН). При ЛН роговичный эпителий замещается конъюнктивальным эпителием, что приводит к росту новообразованных сосудов, хроническому воспалению глазной поверхности, рецидивирующим эрозиям, а также помутнению роговицы.

Диагноз ЛН устанавливается на основании анамнеза и объективного статуса – наличии дефектов эпителия и конъюнктивализации роговицы, которая подтверждается с помощью импрессионной цитологии при обнаружении бокаловидных клеток, а также проведении иммуноцитохимического анализа [1-3]. Также для верификации диагноза выполняется визуализация лимбальных структур с помощью конфокальной микроскопии in vivo [4].

При выраженных помутнениях роговицы, приводящих к значительному снижению остроты зрения, в большинстве случаев выполняется кератопластика. Трансплантация роговицы является эффективной хирургической процедурой для восстановления прозрачности роговицы при условии наличия функциональных ЛЭСК. При поражении лимба роговичный эпителий не регенерирует, и конъюнктива проникает на поверхность трансплантированной роговицы с развитием болезни трансплантата [5].

Для лечения ЛН существуют различные хирургические процедуры, восстанавливающие пул ЛЭСК, однако, к настоящему времени не выработана общепринятая тактика лечения пациентов с ЛН вследствие неоднородности популяции пациентов, недостаточности данных, используемых в клинических исследованиях, различных периодов наблюдения. Для лечения ЛН предложен дифференцированный подход [6]. При частичной ЛН с поражением от четверти до трети лимба следует рассмотреть вопрос о скарификации эпителия с покрытием роговицы амниотической мембраной. При частичной ЛН с вовлечением более трети лимба или полной ЛН тактика лечения зависит от того, является ли заболевание односторонним или двусторонним. При одностороннем поражении лимба в первую очередь должны выполняться конъюнктивальная лимбальная аутотрансплантация (CLAU – conjunctival limbal autograft) или простая аутолимбальная эпителиальная трансплантация (autoSLET – simple limbal epithelial transplantation). При отсутствии положительной динамики следующим этапом проводится трансплантация культивированных ЛЭСК (autoCLET – cultivated limbal epithelial transplantation).

Для двустороннего заболевания важно знать, могут ли применяться системные иммуносупрессанты: при отсутствии возможности иммуносупрессии методом выбора является трансплантация стволовых клеток слизистой эпителия полости рта (COMET – cultivated oral mucosal epithelial transplantation); в том случае, если у пациента может быть подавлен иммунитет, следует выполнить alloSLET, при отсутствии результата далее проводится alloCLET.

Трансплантация культивированных стволовых клеток имеет потенциал развития при лечении ЛН вследствие выбора различных видов скаффолдов, использовании альтернативных источников стволовых клеток, развития генной терапии.

Цель

Оценить эффективность трансплантации аутологичных и аллогенных ЛЭСК на фибриновом

скаффолде при лимбальной недостаточности у экспериментальных животных.

Материал 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.). В эксперименте принимали участие 3 группы кроликов: 1 группа – контрольная (4 кролика), 2 группа – с трансплантированными аутологичными ЛЭСК (4 кролика), 3 группа – с трансплантированными аллогенными ЛЭСК (4 кролика). Всем кроликам заранее была смоделирована лимбальная недостаточность с помощью комбинации щелочного ожога 4% гидроксидом натрия и механического удаления лимба. В условиях операционной под общей анестезией после субтеноновой анестезии была проведена деэпителизации роговицы после аппликации спиртовым раствором. После деэпителизации роговицы проводили тотальное удаление лимбальной ткани. С помощью микрохирургического алмазного дозированного лезвия выделяли участок лимба шириной 4 мм, глубиной 0,2 мм и удаляли на 360 градусов. Далее область лимба обрабатывали 4% раствором гидроксида натрия в течение 25 секунд. В конце процедуры, а также в послеоперационном периоде, проводились инстилляции антисептических препаратов (пиклоксидин 0,05% 4 раза в день), антибактериальных средств (левофлоксацин 0,5%, 4 раза в день), корнеопротекторов (дексапантенол 5% 4 раза в день).

На парном здоровом глазу был проведен забор лимбальной ткани. Для хранения и транспортировки лимбальной ткани использовалась среда Борзенка-Мороз. Культивирование клеток производили в ростовой среде DMEM-F12 и 10% фетальной бычьей сыворотки методом без ферментативной диссоциации7. Далее культивированные ЛЭСК пересаживали на скаффолд на основе фибринового клея «Ивисел».

Через 2 мес. после формирования модели лимбальной недостаточности 1 группе кроликов после удаления наросшего конъюнктивального эпителиального слоя и полной деэпителизации роговицы была установлена МКЛ с фибриновым клеем и произведена блефарорафия. Во 2 и 3 группах на деэпителизированную роговицу были перемещены культивированные аутологичные/аллогенные ЛЭСК на фибриновом скаффолде, сверху установлена МКЛ для защиты материала и произведена блефарорафия. В послеоперационном периоде производились инстилляции антисептических и антибактериальных средств. Через 1 неделю у всех кроликов в 3 группах были сняты швы и удалена МКЛ. Динамику изменения роговичной поверхности оценивали в течение 2 мес. с помощью биомикроскопии, в т.ч. с кобальтовым фильтром после инстилляции раствора флюоресцеина, фоторегистрации на фотощелевой лампе.

Результаты

Комбинация механического удаления ткани лимба и ожога лимбальной зоны гидроксидом натрия приводила к формированию модели лимбальной недостаточности на глазах экспериментальных животных: во всех случаях отмечался рост новообразованных сосудов, формирование помутнений роговицы, наличие кератопатий или эрозий роговицы. Конъюнктивальный фенотип эпителия подтверждался присутствием бокаловидных клеток при проведении импрессионной цитологии.

В 1 группе на протяжении всего периода наблюдения сохранялись эрозии роговицы/эпителиопатии, отмечался дальнейший рост новообразованных сосудов. После трансплантации культивированных клеток во 2 и 3 группах после снятия швов и удаления МКЛ отмечалась полная резорбция фибринового клея. Эпителизация роговицы наступила в среднем через 13 дней, в течение всего периода наблюдения роговичная поверхность оставалась стабильной. Разницы между процессами регенерации у кроликов 2 и 3 группы отмечено не было.

Заключение

Комбинация щелочного ожога и механического удаления ткани лимба является эффективной в создании модели тотальной лимбальной недостаточности. Трансплантация культивированных аутологичных и аллогенных ЛЭСК позволила стабилизировать роговичную поверхность экспериментальных животных. Однако данный метод требует дальнейшего изучения и проведения иммуноцитохимического анализа для определения критериев эффективности лечения.

Страница источника: 178-180

OAI-PMH ID: oai:eyepress.ru:article40457