

## Современные клеточные биотехнологии в офтальмологии. Амниотическая мембрана как субстрат для культивирования стволовых эпителиальных клеток

*Белорусская медицинская академия последипломного образования*

Тяжелые заболевания поверхности глаза, приводящие к недостатку стволовых эпителиальных клеток, вызывают интенсивное помутнение и васкуляризацию роговицы и влекут за собой значительное снижение остроты зрения и слепоту. Для лечения данной патологии требуется выполнение реконструктивных вмешательств с использованием донорских тканей, однако, высокая частота развития реакции отторжения трансплантата и его гибели побуждает офтальмологов к поиску альтернативных методов лечения. Недавние исследования показали, что трансплантация культивированных *ex vivo* на амниотической мембране стволовых клеток и эпителиальных пластов может значительно улучшить прогноз лечения данной категории больных.

Ключевые слова: стволовые клетки, амниотическая мембрана, поверхность глаза, синдром лимбальной недостаточности

Лечение заболеваний и повреждений глаза, при которых имеется выраженная несостоятельность процессов регенерации, приводящая в итоге к значительному снижению остроты зрения и слепоте, остается актуальной проблемой офтальмологии [1, 2, 3, 9, 10].

В настоящее время ведется поиск эффективных способов, которые позволили бы успешно лечить пациентов с тяжелыми ожогами роговицы и конъюнктивы, фиброзирующими кератоконъюнктивитами, язвами роговицы различного генеза, тяжелыми формами синдрома сухого глаза и др. Для реконструкции поверхности переднего отрезка глаза применяют: лечебные мягкие контактные линзы, адгезивные вещества и клеи, аутоконъюнктивальную пластику и трансплантацию аутослизистой ротовой полости, а также трансплантацию донорской роговицы и конъюнктивы, амниотической мембраны, лимбальных ауто-и аллографтов.

В последние годы в литературе рассматривают трансплантацию культивированных стволовых клеток как наиболее перспективный метод, позволяющий влиять на ход репарации тканей организма человека [4, 6, 7]. Современные клеточные биотехнологии успешно применяются в общей комбустиологии, эндокринологии и хирургии. К настоящему времени получены первые положительные результаты использования культивированных стволовых клеток в офтальмологической практике. В настоящее время исследования ученых направлены на выяснение тонких механизмов регуляции процессов дифференцировки стволовых клеток после трансплантации их на поверхность глаза. После подтверждения эффективности и безопасности нового метода лечения станет возможным его применение у пациентов с тяжелыми заболеваниями и повреждениями глаз, ранее неизбежно приводивших к значительному снижению зрения и слепоте.

Особенности регенерации эпителиального покрова поверхности глаза. В нормальных условиях поверхность глаза покрыта роговичным, лимбальным и

конъюнктивальным эпителием. Роговичный эпителий обладает рядом специфических свойств, которые отличают его от других типов покровного эпителия. Во-первых, роговичные эпителиальные базальные клетки являются относительно более зрелыми по сравнению с таковыми у других эпителиальных тканей. Во-вторых, клетки роговичного эпителия обладают выраженной способностью к центрипетальной миграции. В-третьих, роговичный эпителий практически никогда не является источником опухолей. Возникновение опухолей в периферических отделах роговицы связывают с зоной лимба, особенно с пигментсодержащими клетками (Waring et al., 1984).

Поддержание постоянства любой эпителиальной структуры обеспечивается популяцией стволовых клеток (СК), которые представляют собой уникальный источник регенерации клеток, как в физиологических условиях так и при заболеваниях или травмах. СК определяются по их способности к неограниченному и продолжительному размножению, в результате которого возникает, по крайней мере, один тип высоко дифференцированных клеток. Стволовые конъюнктивальные клетки расположены в основном в области сводов. В 1971г М.Davanger и А.Evansen предположили, что лимбальный эпителий является источником стволовых клеток для роговицы, что в последующем было подтверждено многими учеными в эксперименте и клинике (Sun T-T., 1977; Schermer A., 1986; Thoft R.A. et al, 1989; Pellegrini G. et al, 1999). Существует также промежуточная популяция клеток-родоначальников, называемых транзиторными амплифицирующими клетками (ТА-клетки), которые расположены в базальном слое эпителия роговицы и имеют относительно ограниченную пролиферативную активность. Все супрабазальные клетки эпителия являются высоко дифференцированными и, соответственно, не способны к размножению (A.J.W. Huang, S.C.G. Tseng, 1991).

Известно, что роговичный эпителий обладает большими способностями к регенерации. В физиологических условиях происходит достаточно быстрое отмирание поверхностных слоев центральной зоны роговицы. Регенерация роговичного эпителия обеспечивается размножением базальных эпителиальных клеток и их постепенным перемещением в супрабазальные слои. А также делением лимбальных СК и последовательной центрипетальной миграцией от периферии роговицы [4, 7].

Фенотип СК контролируется как внутренними так и внешними факторами, причем последние определяются микросредой, или так называемой нишей СК (Watt F.M., Hogan B.L, 1993) В развитии новых СК ключевое значение придают именно микросреде, под которой понимают контактирование с окружающими клетками и взаимодействие с экстрацеллюлярным матриксом и факторами роста.

Предполагается, что подобно СК гематопоезического ряда, эпидермальному и кишечному эпителию, лимбальные СК относятся к долгоживущим клеткам с медленным клеточным циклом, низкой митотической активностью и устойчиво низкой степенью дифференцировки. Однако, они могут активироваться при возникновении потребности в регенерации посредством увеличения их собственной популяции в процессе размножения и/или дифференцировки в ТА-клетки.

В противоположность СК, ТА-клетки относятся к короткоживущим клеткам с быстрым клеточным циклом, которые способны за счет этих качеств эффективно увеличить количество эпителиальных клеток при ограниченном количестве митозов (Lehrer M.S. et al, 1998).

Лимбальные СК и/или стромальная микросреда, в которой они находятся, могут повреждаться значительным количеством факторов, вызывая клиническую картину, называемую синдромом лимбальной недостаточности (см. таблица 1). Он включает в себя следующие признаки: наличие конъюнктивального паннуса, хроническое воспаление, помутнение роговицы различной степени выраженности, неоваскуляризация, плохое взаимодействие эпителиальных клеток, которое проявляется неровностью поверхности, рецидивирующими эрозиями и язвами, деструкцией базальной мембраны. По степени выраженности выделяют частичную и тотальную лимбальную недостаточность (S.C.G. Tseng, 1995). По патогенезу синдром лимбальной недостаточности (СЛН) может быть разделен на 2 большие группы:

1. СЛН, вызванный первичной деструкцией лимбальных стволовых клеток
2. СЛН, вызванный первичной деструкцией лимбальной стромы

Таблица 1

Заболевания роговицы, проявляющиеся СЛН (Grueterich M., Espana E.M., Tseng S.C.G., 2003.)

Нозологическая единица	Повреждение клеток лимба	Повреждение стромы лимба
1. Наследственные:		
• Апиридия		+
• Кератит, ассоциированный с множественной эндокринной недостаточностью		+
• Эпидермальная дисплазия	+	
2. Приобретенные:		
• Химические и термические ожоги	+	
• Синдром Стивенса-Джонсона, токсический эпидермальный некролизис	+	
• Множественные хирургические вмешательства, либо криотерапия лимба	+	
• Кератопатия, индуцированная ношением контактных линз	+	
• Тяжелая микробная инфекция с вовлечением лимба	+	
• Приемление антиметаболитов (5-фторурацил, митомидин С)	+	+
• Раднация	+	+
• Хронический лимбит (Вернала, атопический, фликтенулезный)		+
• Периферический язвенный кератит (язва Мурена)		+
• Искриотрофическая кератопатия		+
• Хроническая буллезная кератопатия		+
• Птеригиум	+	+

Таким образом, для успешного лечения заболеваний, протекающих с синдромом лимбальной недостаточности, необходим дифференцированный подход, учитывающий тип и степень его выраженности. В настоящее время существует ряд методов, способствующих поддержанию популяции СК:

- трансплантация амниотической мембраны,
- аутолимбальная трансплантация (пересадка участка лимба, взятого с контрлатерального глаза при одностороннем поражении),

- аллолимбальная трансплантация (пересадка участка лимба, взятого у доноров),

- пересадка культивированных *ex vivo* стволовых эпителиальных клеток.

Впервые способ лечения СЛН путем трансплантации амниотической мембраны (АМ) был предложен S.C.G. Tseng et coll. D 1997 г. В настоящее время известна его эффективность при частичной лимбальной недостаточности, что объясняется противовоспалительным и антиапоптотическим эффектом базальной мембраны амниона, а также наличием значительного количества факторов роста и других биологически активных веществ в его строме и эпителии, что способствует восстановлению поврежденной стромы лимба [3, 10].

В случае тотальной лимбальной недостаточности необходима пересадка ауто-либо аллогенных лимбальных стволовых клеток. Этот метод был впервые предложен Kenyon and Tseng в 1989г [5]. В последствии его эффективность в лечении частичного либо тотального одностороннего СЛН, вызванного различными заболеваниями, была подтверждена другими исследователями. Донорский материал может быть взят со здорового контрлатерального глаза (лимбальный аутографт), либо от донора-родственника (лимбальный аллографт), либо это может быть кадаверный кератолимбальный аллографт [5, 9]. Однако, несмотря на полученные отдельными авторами обнадеживающие результаты лечения СЛН, были выявлены следующие недостатки. Во-первых, при использовании в качестве донора собственного контрлатерального глаза пациента либо зрячего глаза родственника, существует риск вызвать персистирующее воспаление и помутнение роговицы на глазу донора, что, безусловно, не может удовлетворить ни пациента, ни хирурга. Во-вторых, при использовании кадаверного материала высок риск отторжения трансплантата, кроме того, забор материала и его использование должны осуществляться в ранние сроки после смерти донора, что сопряжено с техническими сложностями.

В последние годы офтальмологами изучается возможность применения в клинике новой технологии, называемой культивированием *ex vivo* эпителиальных стволовых клеток, которая позволяет избежать потенциальных осложнений, связанных с пересадкой лимбального аутографта.

Условия культивирования СК. Экспериментальными исследованиями было доказано, что для длительного культивирования и размножения различных типов эпителиальных клеток необходимо наличие питательной среды либо субстрата, присутствие фибробластов, а также достаточное количество факторов роста и цитокинов (Green H., 1979; Rochat, 1994).

Система для культивирования, содержащая фибробласты и сокращенно называемая 3Т3-система, была применена для выращивания эпителиальных клеток поверхности глаза кролика (Sun T-T et al., 1977;) и человека (Pelligrini G., 1999). При изучении клонированных лимбальных эпителиальных клеток было обнаружено, что они успешно консервируются в 3Т3-системе (Lindberg K., 1993). Отсюда родилась идея, что функция СК поддерживается стромальными фибробластами, но до сих пор остается неясной природа такой активности фибробластов.

Методы культивирования стволовых эпителиальных клеток.

В настоящее время существуют различные модели культивирования клеток эпителия и СК. Впервые Green and Rheinwald в 1975г. разработали способ

получения клеточных культур человеческих кератиноцитов, взятых из эпидермиса, который используется в лечении ожогов кожи и в настоящее время.

В 1982 г. Friend et al. предложили способ культивирования роговичных эпителиальных клеток на базальной мембране, полученной из роговиц кроликов. В дальнейшем изучалась возможность применения других субстратов, таких как гидрогель, покрытый фибронектином, коллагеновые матрицы, фибрин и т.д., для культивирования эпителия *ex vivo* (Kobayashi, Ikada, 1991; Minami et al., 1993; Rama et al. 2001).

Rama et al. в 2001г использовали фибриновый субстрат для культивирования лимбальных эпителиальных клеток, взятых с контрлатерального здорового глаза. Они трансплантировали полученные клетки и получили хороший результат – эпителизация в течение первой недели. Поскольку фибриновый гель в последствии абсорбируется, возможна трансплантация клеток на субстрате непосредственно на роговицу.

Сегодня для культивирования применяются системы эксплантов, клеточных суспензий, система выращивания многослойных культур эпителиальных клеток в интерфазе вода – воздух. Общие принципы получения культур стволовых клеток, тем не менее, остаются прежними.

1. Получение донорских стволовых клеток.
2. Выбор соответствующего субстрата для культивирования клеток.
3. Получение питательной среды, содержащей эпителиальные клетки.
4. Мониторинг клеточного роста.
5. Изучение характеристик полученной культуры клеток.

Характеристика амниотической мембраны как субстрата для культивирования СК.

В последнее время разными исследователями *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано, что амниотическая мембрана (АМ) может быть успешно использована в качестве субстрата для культивирования эпителиальных СК и их последующего применения в лечении тяжелой патологии поверхности глаза, протекающей с СЛН [3, 4, 6, 7, 8].

АМ – является самой внутренней из плодных оболочек. Она состоит из монослоя эпителиальных клеток, толстой базальной мембраны и аваскулярной стромы. Благодаря содержанию значительного количества цитокинов, факторов роста, металлопротеаз, антимикробных факторов АМ способствует культивированию на своей поверхности эпителиальных клеток. В таблице 2 отражены характеристики АМ и предположительные механизмы ее действия. АМ не содержит антигенов гистосовместимости и не является, таким образом, иммуногенной, поэтому ее применение не требует иммуносупрессии, которая обычно применяется при трансплантации других тканей.

#### Таблица 2

Свойства амниотической мембраны как субстрата для культивирования стволовых клеток. (Grueterich M., Espana E.M., Tseng S.C.G., 2003.)

Характеристики АМ	Предполагаемый механизм действия при культивировании лимбальных СК
<b>Амниотический эпителий:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Цитокины EGF, KGF, HGF, bFGF, NGF, TGF-<math>\alpha</math>, TGF-<math>\beta</math>1, TGF-<math>\beta</math>2</li> <li>• Тканевые ингибиторы металлопротеаз</li> <li>• Тромбоспондин-1</li> </ul>	<p>Предотвращают преждевременный контакт с компонентами экстрацеллюлярного матрикса</p> <p>Предотвращают повреждение клеток цитокинами, обеспечивают поддержание клеточного цикла и выживаемость клеток</p>
<b>Амниотическая БМ:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Коллаген IV типа (<math>\alpha</math>-цепь), VII типа</li> <li>• Ламинин I и 5</li> <li>• Фибронектин</li> </ul>	<p>Облегчают миграцию и адгезию клеток к экстрацеллюлярному матриксу</p> <p>Активирует пути межклеточных взаимодействий посредством интегринов</p>
<b>Амниотическая строма</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Цитокины NGF, HGF, KGF, TGF-<math>\alpha</math>, TGF-<math>\beta</math>1, TGF-<math>\beta</math>2, EGF, bFGF</li> <li>• Тканевые ингибиторы металлопротеаз</li> <li>• Тромбоспондин-1</li> </ul>	<p>Обеспечивают поддержание благоприятной микросреды</p> <p>Обеспечивают взаимодействие между лимбальным эпителием и стромой</p>

Описаны различные методы культивирования эпителиальных клеток на АМ с сохраненным либо удаленным эпителием. При этом используется культура 3Т3 фибробластов. В 2002 г Grueterich M. et al сообщили, что эпителиальные клетки, культивированные на интактной АМ, имеют медленный клеточный цикл и не продуцируют К3 и К12 кератины и конексин Сх43. Эти характеристики делают их схожими с лимбальными базальными клетками, которые расцениваются как существующие *in vivo* стволовые клетки.

Koizumi N. et al. (2000), получили данные, свидетельствующие о том, что использование деэпителизированной АМ дает определенные преимущества. Авторы культивировали лимбальные эпителиальные клетки кролика и сравнивали их миграцию через 14 дней. Клетки быстрее мигрировали по деэпителизированной, чем по интактной АМ. Более того, лимбальные клетки, культивируемые на деэпителизированной АМ формировали многослойный эпителий с более прочными межклеточными контактами, который прикреплялся непосредственно к подлежащей строме АМ, что делало структуру эпителия в целом более стабильной. Исходя из вышеизложенного авторы рассматривают деэпителизованную АМ как наиболее подходящий субстрат для культивирования стволовых эпителиальных клеток.

В ходе экспериментальных исследований Koizumi N. et al. (2002) было установлено, что миграция СК от донорских эксплантов к субстрату происходит не во всех случаях. Кроме того, культивируемые клеточные пласты не всегда содержат достаточное количество СК. Авторами была разработана методика культивирования клеточных суспензий эпителия роговицы с высоким содержанием СК и получены многослойные культуры клеток с большим количеством десмосомальных межклеточных соединений и относительно меньшим интерцеллюлярным пространством. Применение этих культур в клинике показало, что использование многослойных дифференцированных эпителиальных пластов является более эффективным, чем недифференцированных однослойных. Объясняется это тем, что при тяжелых патологических состояниях, таких как синдром Стивенса-Джонсона, ожогах, происходит значительное повреждение поверхности глаза и прилегающего

века. При трансплантации на такую поверхность культивированных клеток они легко слущиваются при механическом трении во время мигательных движений.

Таким образом, в настоящее время установлены следующие особенности культивирования СК [4, 6, 7, 8]:

1. Система культивирования «СК на интактной АМ» благоприятствует сохранению свойств и размножению лимбальных СК.

2. При использовании системы культивирования «СК+АМ, лишенная эпителия, в отсутствие 3Т3 фибробластов» получаемые клетки схожи по характеристикам с ТА-клетками роговицы.

3. При использовании системы культивирования «АМ, лишенная эпителия +3Т3 фибробласты» происходит замедление, но не предотвращение дифференцировки лимбального эпителия.

Результаты клинического применения культивированных СК В настоящее время имеется относительно небольшой клинический опыт применения культивированных СК. Впервые новый метод лечения применили Tsai R. et coll. (2000) у 6 пациентов с односторонним частичным или тотальным СЛН. Они использовали ткань аутолимба, полученную путем биопсии контрлатерального глаза, для последующего культивирования на криоконсервированной интактной АМ и получили успешный результат: увеличение остроты зрения в 83% случаев, в реэпителизация без васкуляризации в 100% (при сроке наблюдения за пациентами в течение 15 месяцев).

Schwab I.R et coll. (2002) для лечения 14 пациентов использовали ауто-и аллогенные лимбальные эпителиальные клетки, которые выращивались в культуре, содержащей 3Т3 фибробласты, а затем помещались на лишенную эпителия АМ. У 6 из 10 пациентов с аллогенным трансплантатом была достигнута эпителизация поверхности роговицы при сроке наблюдения от 6 до 19 месяцев.

Koizumi N. et al. (2001) применили новый способ лечения у 2 пациентов с острым синдромом Стивенса-Джонсона, у которых не удавалось достичь эпителизации при использовании традиционных методов. Они культивировали аллогенную лимбальную ткань, взятую от донорской роговицы, на лишенной эпителия АМ с добавлением 3Т3 фибробластов. Выросший монослой клеток был пересажен в область дефекта поверхности роговицы и конъюнктивы. Была достигнута эпителизация поверхности, в течение последующих 6 месяцев результат оставался стабильным. Затем авторы применили тот же метод при лечении 13 пациентов с тотальным СЛН и периодом наблюдения около 12 месяцев. У 10 из 13 пациентов возник рецидив первичной патологии.

Grueterich M. et al. (2003) выполнили гистологические и иммуногистологические исследования образцов роговицы, полученных по истечении 5 месяцев после успешной трансплантации культивированных лимбальных клеток (на интактной АМ без добавления фибробластов) по поводу тотального СЛН, вызванного химическим ожогом. Результаты показали, что трансплантированная АМ интегрируется в структуру роговицы, эпителиальные клетки имеют фенотип лимбальных эпителиальных клеток, в которых не определяется экспрессии К3-кератина и Сх43-конексина. Эти данные показывают, что стволовые лимбальные клетки, культивированные на интактной АМ могут некоторое время сохранять свои свойства даже в нехарактерной для них микросреде – в центральной зоне роговицы. Поверхность роговицы оставалась прозрачной,

аваскулярной, гладкой в течение 21 месяца наблюдения. Таким образом, лимбальные эпителиальные клетки действительно поддерживают свою популяцию на поверхности роговицы [4].

Shimazaki J. et al. (2002) доложили о 13 случаях трансплантации культивированных лимбальных клеток, из которых 7 были аллогенными и 7 были получены от близких родственников. Восстановление поверхности роговицы было достигнуто в 46,2% случаев. В 5 случаях возник рецидив васкуляризации, у 1 пациента на поверхности глаза был зафиксирован рост ороговевающего эпителия, у 1 пациента эпителизации вообще не было достигнуто. У этих авторов успешные результаты при пересадке культивированных клеток сравнимы с их результатами пересадки лимба и трансплантации АМ.

Nakamura T. et al. (2004) использовали для лечения 4 пациентов с тотальным СЛН культивированные на АМ эпителиальные клетки аутослизистой ротовой полости [8]. У всех пациентов было отмечено уменьшение степени выраженности рубцовых изменений конъюнктивы, уменьшения количества новообразованных сосудов на поверхности роговицы и повышение остроты зрения.

**Выводы.**

Полученные к настоящему времени результаты экспериментальных, лабораторных и клинических исследований убедительно доказывают, что стволовые эпителиальные клетки роговицы и конъюнктивы могут успешно культивироваться *in vitro* на АМ, которая служит уникальным субстратом, обеспечивающим рост и размножение СК. Эта концепция является основной в новом методе лечения тяжелой патологии поверхности глаза, сопровождающейся синдромом лимбальной недостаточности. В дальнейшем перспективным представляется изучение точной природы тонких взаимодействий между субстратом и растущими на нем СК. Необходимо разработать методику выращивания стабильных клеточных пластов, способных продолжать рост и направленную дифференцировку после трансплантации на поверхность глаза. Поскольку имеются данные о том, что простого удаления эпителия АМ достаточно для запуска дифференцировки стволовых эпителиальных клеток, метод культивирования может помочь в дальнейшем определить, какие гены задействованы в этом процессе, а также выяснить способы управления ими. Необходимо разработать четкие диагностические критерии и показания к использованию метода трансплантации культивированных стволовых и эпителиальных клеток, а также оценить степень его эффективности и безопасности при различных заболеваниях органа зрения.

### **Литература**

1. Майчук, Ю.Ф. Терапевтические алгоритмы при инфекционных язвах роговицы. / Ю.Ф. Майчук // Вестн. офтальмол. – 2000. – № 3. – С. 35 – 37.
2. Макаров, П.В. К хирургической тактике лечения тяжелой и особо тяжелой ожоговой травмы глаз (сообщение 2). / П.В. Макаров // Вестн. офтальмол. – 2002. – № 4. – С. 8 – 10.
3. Burman, S. Ophthalmic application of preserved human amniotic membrane: a review of current indications / S.Burman [et al.] // Cell and Tissue Banking. – 2004. – N5. – P. 161 – 175.
4. Grueterich, M. Ex Vivo Expansion of Limbal Epithelial Stem Cell: Amniotic Membrane Serving as a Stem Cell Niche / M. Grueterich, E.M Espana., S.C.G.Tseng // Survey of Ophthalmol. – 2003. – Vol. 48, N 6 – P. 631 – 646.



5. Kenyon, K.R. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. / K.R. Kenyon, S.C.G. Tseng // Ophthalmology. – 1989. – Vol. 96 – P.709 – 723.
6. Kinoshita, S. Transplantable cultivated epithelial sheet for ocular surface reconstruction / S. Kinoshita, N. Koizumi, T.Nakamura // Exp. Eye research. – 2004. – Vol. 78 – P. 483 – 491.
7. Lavker, R. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle / R.Lavker, S.Tseng, T.Sun // Experimental eye research. – 2004. – Vol. 78. – P. 433 – 446.
8. Nakamura, T. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. / T. Nakamura [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2004. – Vol. 88. – P. 1280 – 1284.
9. Rao, S.K. Limbal allografting from related live donors for corneal surface reconstruction. / Rao S.K. [et al.] // Ophthalmology. – 1999. – Vol. 106. – P.822 – 828.
10. Versen-Huynck, F. Application of sterilised human amnion for reconstruction of the ocular surface. / F. von Versen-Huynck, U. Hesselbarth, D.E. Müller // Cell and Tissue Banking. – 2004. – Vol. 5. – P. 57 – 65.