

УДК 611.018.7:611.841:616–003.93

© Коллектив авторов, 2013

## РОЛЬ ЛИМБАЛЬНЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ

**А. Г. Попандопуло, А. С. Кавелина, О. Н. Иванова\*, Г. И. Дрожжина\****Лаборатория клеточного и тканевого культивирования (зав. – д.мед.н., проф. А. Г. Попандопуло.), ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака НАМН Украины». 83045 Украина, г. Донецк-47, пр. Ленинский 47.**\*Отделение патологии и микрохирургии роговицы ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова НАМН Украины» (зав. – д. мед. н., проф., с. н. с. Г.И.Дрожжина). 65061 Украина, г. Одесса Французский бульвар 49/51. E-mail: annakavelina@mail.ru*

### THE ROLE OF LIMBAL CELLS IN REGENERATION OF CORNEA

**A. G. Popandopulo, A. S. Kavelina, O. N. Ivanova, G. I. Drozhzhina**

#### SUMMARY

The main functions of the corneal epithelium are regeneration after injury and protection that ensure the stability of the tear film [8, 11]. Correction of a surface epithelial damage is provided by division and migration of the basal epithelial cells of the cornea, as well as transformation and centripetal movement of the cambium (stem) cells of the limb. The stem cells (SC) are located in the basal limb epithelium [10, 11]. One of the most modern methods of treatment is autolimbic transplantation, in which the cells are taken from the contralateral limb of the healthy eye [10]. The recent studies have been aimed at improving the technology of isolation and culturing the limbal epithelial cells of the cornea, developing the ways of capture and delivery of these cells into the cornea tissue, and establishing the fine mechanisms of differentiation of SC after transplanting them onto the eye surface, which is a topical issue of ophthalmology

### РОЛЬ ЛІМБАЛЬНИХ КЛІТИН В РЕГЕНЕРАЦІЇ РОГІВКИ

**А. Г. Попандопуло, А. С. Кавеліна, О. Н. Іванова, Г. І. Дрожжина**

#### РЕЗЮМЕ

Основними функціями рогівкового епітелію є регенерація після пошкодження і захисна, що забезпечує стабільність слізної плівки [8, 11]. Відновлення поверхневого епітелію при його пошкодженнях відбувається за рахунок поділу і міграції базальних епітеліоцитів рогової оболонки, а також трансформації і доцентровий руху камбіальних (стовбурових) клітин лімба. Стовбурові клітини (СК) лімба розташовані у базальному епітелії [10, 11]. Одним з найбільш сучасних методів лікування є аутолімбальна трансплантація, при якій клітини лімба беруться з контрлатерального здорового ока [10].

Останні дослідження спрямовані на удосконалення технологій виділення та культивування лімбальних епітеліальних клітин рогівки, розробку способів фіксації і доставки цих клітин в тканини рогівки, а також з'ясування тонких механізмів регуляції процесів диференціювання СК після трансплантації їх на поверхню очі, що є актуальною проблемою офтальмології, ор, старший научний співробітник Г. І. Дрожжина.

**Ключевые слова: лимбальные эпителиальные клетки, камбиальные стволовые клетки, амниотическая мембрана**

Последние исследования направлены на усовершенствование технологий выделения и культивирования лимбальных эпителиальных клеток роговицы, разработку способов фиксации и доставки этих клеток в ткани роговицы, а также выяснение тонких механизмов регуляции процессов дифференцировки стволовых клеток (СК) после трансплантации их на поверхность глаза, что является актуальной проблемой офтальмологии [2].

Здоровая поверхность глаза сформирована двумя типами эпителия – роговичным и конъюнктивальным. Передний поверхностный эпителий является одной из важнейших структур обеспечивающих гомеостаз роговицы и глаза в целом. Соответственно и патологические процессы, развивающиеся при нарушении целостности и адекватности регенераторных процессов эпителия многообразны. При длительном отсутствии эпителиального покрова в роговице развиваются метаболические нарушения, что приводит к развитию разнообразных по клиническому проявлению патологических состояний.

Восстановление поверхностного эпителия при его повреждении происходит за счёт деления и миграции базальных эпителиоцитов роговой оболочки, а также трансформации и центростремительного движения камбиальных (стволовых) клеток лимба [5]. Дополнением к традиционным методам стимуляции восстановительных процессов при серьезных нарушениях репаративной регенерации роговицы может стать трансплантация СК [9, 11, 12].

Благодаря своим уникальным свойствам амниотическая мембрана (АМ) человека на сегодняшний день достаточно широко применяется в офтальмологической практике [1,2,3,4,5]. АМ успешно используют как субстрат для культивирования стволовых лимбальных клеток, взятых со здорового глаза, что позволяет добиваться эпителизации поверхности даже в случаях выраженной лимбальной недостаточности [9]. Целью исследования явилось определение жизнеспособности культивированных лимбальных клеток на поверхности АМ после крио-замораживания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК) проводилось в лаборатории клеточного и тканевого культивирования ГУ «ИНВХ им. В.К. Гусака НАМН Украины», отвечающей стандартам GMP с соблюдением асептических условий. Для выделения первичных культур использовали кадаверные и энуклеированные роговицы. Образцы трижды отмывались в фосфатно-буферном растворе. С поверхности роговиц выделялись зоны палисадов Фогта, содержащие наибольшее количество ЛЭСК. Разработано несколько способов выделения и культивирования с ферментативной обработкой [6] и получения клеток из исходного материала, где биоптат помещается на покрытое синтетическим аналогом внеклеточного матрикса поли-Д-лизином покровное стекло либо на поверхность культурального флакона, обработанного фибронектином. Для выделения использовалась питательная среда DMEM/F12 1:1, содержащая 10% ЭТС, антибиотики и ростовые факторы. Клеточные линии культивировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе, содержащем 95% влаги при температуре 37°C. После достижения конфлюэнтного слоя проводилось пассирование. Наблюдение осуществлялось с помощью инвертируемого светового микроскопа фирмы Leika. После криозамораживания АМ несколько раз промывали фосфатно-буферным раствором, затем помещали стромальной стороной вверх в 6-ти луночное плато. На поверхность мембраны наносили 200 тыс. ЛЭСК в 2-х мл питательной среды. Смену среды проводили каждые 3-е суток по проработанному нами протоколу [7]. Визуализацию клеточных культур осуществляли с помощью фазово-контрастной микроскопии. Для прижизненной окраски использовали красители РКН 26 и РКН 67, обладающие флуоресценцией. В течение 1–2 недель после достижения монослоя, мембрану с культивированными лимбальными клетками помещали в криопакет, содержащий криоконсервант и запаивали. Согласно специальному протоколу с помощью программного замораживателя IceCube 1810 („SY-LAB“) образцы подвергаются замораживанию, обеспечивающее оптимальную скорость заморозки клеток и сохранение их жизнеспособности.

Для определения жизнеспособности ЛЭСК на поверхности мембраны через два месяца образцы размораживали, удаляли криопротектор и окрашивали флуоресцеином ацетат (FDA). Визуализацию клеточных линий на АМ осуществляли с помощью инвертируемого светового микроскопа Leika PMIL, рабочей станции с обработкой изображения LEIKA QWIN 500 Standart и видеокамеры JVC–C 1380.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение последних четырех лет в лаборатории клеточного и тканевого культивирования проводятся экспериментальные исследования по внедрению но-

вых методов выделения первичных культур клеток роговицы человека и изучению влияния культивированных клеток на регенерационные процессы.

Особое внимание направлено на культивирование ЛЭСК на различных субстратах для создания благоприятного микроокружения, способствующего формированию межклеточных взаимосвязей, сохранению и делению клеток роговицы.

Нами установлено, что при соблюдении протокола криозамораживания сохраняется жизнеспособность 70–80%. Для дальнейшего изучения жизнеспособности культивированных ЛЭСК необходимо разработать технологию криоконсервации, оптимизировать программу замораживания-отогрева, подобрать криозащитные среды и адекватные низкотемпературные криопакеты.

В исследованиях мы использовали криозамороженную АМ в качестве носителя культивированных клеток. Преимущество метода является свойства мембраны, представляющей наиболее подходящий субстрат для культивирования ЛЭСК. Для развития новых СК большое значение имеет микросреда, где происходит контактирование с окружающими клетками и взаимодействие с матриксом и факторами роста. Мембрана моделирует образ своеобразной ниши для стволовых клеток.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенные исследования по изучению жизнеспособности культивированных ЛЭСК после криозамораживания на АМ может быть эффективны для широкого внедрения в клиническую практику.

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. Своевременное применение данного метода лечения может уменьшить потребность в радикальных хирургических вмешательствах.

Необходимо детальное и всестороннее изучение пролиферации и дифференциации СК на данном субстрате, необходимы инструменты контролируемого управления этими процессами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Амбариумян А. В. Многослойная трансплантация амниотической мембраны при нейротрофических язвах различной этиологии: сборник науч. тр. Рос. общенац. офтальмол. форум.– Т. 2.– М., 2009.– С. 251–255.
2. Гундорова Р. А. и др. Применение амниотической мембраны в офтальмологии: обзор литературы // Рефракционная хирургия и офтальмология.– 2007.– № 2.– С. 27–31.
3. Драваджян З. Х., Амбариумян А. В., Овакмян А. В. Применение амниотической мембраны при

перфорациях роговицы: сборник науч. тр. Рос. общенационального офтальмологического форума. – Т. 2. – М., 2009. – С. 280–284.

4. Миллюдин Е. С. Амниопластическая хирургия в комплексном лечении эпителиальной патологии переднего отдела глаза: автореф. дис. д-ра мед. наук / Е. С. Миллюдин Самара, 2007. – 49 с.

5. Сухинин М. В. Источники и скорость регенерации переднего эпителия роговицы при различных травматических повреждениях сосудистого русла перилимбальной зоны глаза / М. В. Сухинин, В. Г. Гололобов, И. В. Гайворонский // Материалы конф. ученых-морфологов Санкт-Петербурга «Современные проблемы морфологии» – СПб.: Элбис-СПб 2009. – С. 132–134.

6. Гринь В. К., Попандопуло А. Г., Кавелина Г. С., Пасечникова Н. В., Дрожжина Г. И., Иванова О. Н., Патент Украины № 65507 А61F 9/00–12.12.2011, Бюл. № 23, 2011 г. Способ отримання культивованих лімбальних клітин.

7. Гринь В. К., Попандопуло А. Г., Кавелина Г. С., Пасечникова Н. В., Віт В. В., Дрожжина Г. И., Иванова О. Н., Патент Украины № 65506 А61F 9/00–12.12.2011, Бюл. № 23, 2011 г. Способ отримання транс-

плантата лімбальних клітин на амніотичній оболонці.

8. Dua H. S. et al. The amniotic membrane in ophthalmology. Surg. Ophthalmol / 2004. – Vol. 49, № 1. – P. 51–77.

9. Grueterich M., Espana E. M., Tseng S. C. G. Ex Vivo Expansion of Limbal Epithelial Stem Cell: Amniotic Membrane Serving as a Stem Cell Niche // Survey of Ophthalmol. – 2003. – Vol. 48 (6). – P. 631–646.

10. Hazlett L. D. Epithelial desquamation in the adult mouse cornea: A correlative TEM-SEM study // Ophthalmic Res. – 1980. – Vol. 12. – P. 315.

11. He Y., Sun B., Ding X. Limbal epithelial autograft transplantation for treatment of unilateral fibrous vascularized cornea caused by chemical burns // Chung-Hua-Yen-Ko-Tsa-Chih. – 1996. – Vol. 32 (1). – P. 11–14. 13. Lavker R., Tseng S., Sun T. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle // Experimental eye research. – 2004. – Vol. 78. – P. 433–446.

12. Pfister R. R. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells // CLAO-J. – 1994. – Vol. 20 (1). – P. 64–72.