

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕРАПИИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ПРИ ОЖГОВЫХ ПОРАЖЕНИЯХ РОГОВИЦЫ

Недзьведь Н. А., Гузов С. А.

Белорусский государственный медицинский университет,
Кафедра патологической анатомии,
г. Минск

Ключевые слова: морфологический анализ, повреждения роговицы, лимбальные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки.

Резюме. Данная работа посвящена оценке степени регенерации поврежденной роговицы эффективности применения терапии стволовыми клетками по сравнению с терапией традиционными методами.

Resume. This study is dedicated to analysis of stem cells therapy efficiency in comparison to traditional methods treatment.

Актуальность. Различные виды повреждения роговицы достаточно широки и имеют высокое социальные и экономические последствия. Без должного лечения, повреждения роговицы могут привести к сильному ухудшению зрения. На сегодняшний день одним из наиболее распространённых методов лечения является кератопластика донорской роговицы, но данный способ лечения сталкивается с рядом проблем: большие трудности при поиске донора и, даже если донор был найден, роговичный трансплантат слабо приживается. Альтернативным методом является терапия стволовыми клетками, а именно трансплантация собственных культивируемых мезенхимальных стволовых клеток и лимбальных стволовых клеток.

Цель: проанализировать эффективность терапии стволовыми клетками по сравнению с лечением традиционными методами с помощью морфологического метода исследования в эксперименте на кроликах.

Задачи:

1. Провести морфологический анализ опытных и контрольных препаратов глаз кроликов в эксперименте.
2. Провести анализ степени регенерации и состояния собственной пластинки роговицы на опытных и контрольных препаратах глаз кроликов.
3. Сравнить эффективность проведенного лечения с использованием трансплантации стволовых клеток и традиционных методов лечения в эксперименте.

Материал и методы. Ранее объединенным коллективом сотрудников Белорусского Государственного Медицинского Университета и Института биофизики и клеточной инженерии НАН РБ было проведено исследование, включавшее себя следующие этапы:

1. Разработка схемы клеточной терапии повреждений роговицы у экспериментальных животных.
2. Провести забор жировой орбитальной и лимбальной ткани глаза для выделения и культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и

лимбальных стволовых клеток. Материал передан сотрудникам Республиканского научного медицинского центра клеточных технологий (РНМЦ) Института биофизики и клеточной инженерии для выделения и культивирования стволовых клеток.

3. Создание экспериментальной модели химического повреждения роговицы кролика. Щелочной ожог был вызван аппликацией фильтровальной бумаги, смоченной в 2,5% растворе гидроксида натрия.

4. Лечение химического ожога было начато в тот же день. У каждого кролика (10 штук-20 глаз) терапия стволовыми клетками применялось к правым глазам, которые являлись опытными, левые глаза являлись контрольными. На протяжении лечения использовались: антибиотик фторхинолонового ряда Sol. Levofloxacin 0,5%, лубриканты (корнерегель, офтагель), введение стволовых клеток один раз в день в опытные (правые) глаза. Лечение опытных (левых) глаз было аналогичным, за исключением терапии стволовыми клетками.

5. Последовательное выведение кроликов на 5, 14 и 30 день. В последствии глазные яблоки удалялись, из них вырезались поперечные кусочки по всему периметру глаза в проекции дефекта роговицы. В последующем после стандартной проводки материала в спиртах изготавливались парафиновые срезы глаз, толщиной 3 микрона. Гистологические препараты окрашивались гематоксилином и эозином.

Результаты и их обсуждение. Был произведен морфологический анализ полученных препаратов (таблица 1).

Таблица 1. Морфологические изменения в опытных и контрольных препаратах

	Контроль	Опыт
5 дней	—Дефект эпителия роговицы —Гомогенизация базальной мембраны роговицы —Разволокнение соединительной ткани собственной пластинки роговицы	—Неравномерная регенерация многослойного эпителия роговицы —Гомогенизация соединительной ткани собственной пластинки —Воспалительная реакция по периметру поражения
14 дней	—Неравномерная регенерация эпителия. —Неравномерное утолщение регенерирующего эпителия. —Очаговый кератоз регенерирующего эпителия. —Разволокнение соединительной ткани, как проявление её отека	—Вакуолизация регенерирующих эпителиальных клеток, неравномерная регенерация эпителия. —Полнокровие соединительной ткани собственной пластинки роговицы. —Эозинофилия соединительной ткани
30 дней	—Неравномерная регенерация эпителия в виде сосочкообразных утолщений —Разволокнение соединительной ткани сохраняется	—Регенерация эпителия носит равномерный характер. —Соединительная ткань без признаков отека. —Эозинофилия основного вещества соединительной ткани собственной пластинки роговицы.

На 5 день в контрольных препаратах наблюдались следы от ожога в виде дефекта эпителия роговицы, гомогенизации базальной мембраны роговицы (Боуменовой мембраны), разволокнение соединительной ткани собственной пластинки роговицы, что являлось проявлением отека, также отмечена

воспалительная реакция в виде значительного скопления сегментоядерных лейкоцитов по периметру дефекта.

В опытных препаратах наблюдалась начавшаяся неравномерная регенерация многослойного эпителия роговицы с участками истончения эпителия, гомогенизация соединительной ткани собственной пластинки и менее заметная воспалительная реакция по периметру поражения (рисунок 1).

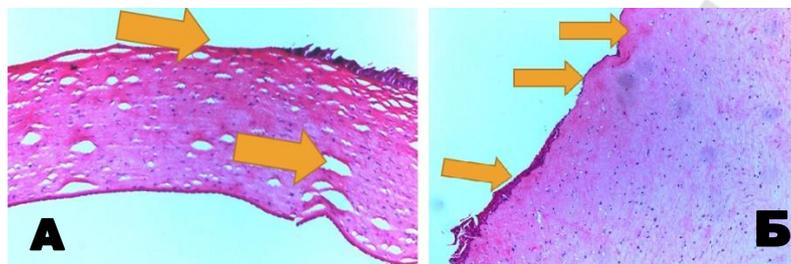


Рисунок 1 – Морфологические изменения на пятый день в контрольных А (дефект эпителия, разволокнение соединительной ткани собственной пластинки) и опытных препаратах Б (участки истончения и утолщения эпителия, гомогенизация соединительной ткани собственной пластинки). Окраска гематоксилин и эозин, x100.

На 14 день в контрольных препаратах отмечалась неравномерная регенерация эпителия, представленная участками истончения и увеличения рядности многослойного эпителия, очаговым кератозом эпителия. Отмечено разволокнение соединительной ткани собственной пластинки, как проявление её отека и эозинофилия основного вещества соединительной ткани.

В опытных препаратах наблюдалась вакуолизация и неравномерная регенерация эпителия. Имело место паретическое расширение сосудов и полнокровие соединительной ткани по периметру поражения, как признак артериальной воспалительной гиперемии, приводящей к усилению регенерации эпителия. Гомогенизация соединительной ткани отмечена только в верхних слоях роговицы и была менее выраженной, чем на контрольных препаратах (рисунок 2).

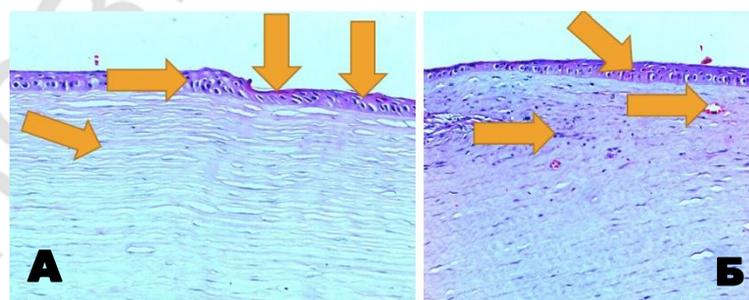


Рисунок 2 – Морфологические изменения на четырнадцатый день в контрольных А (неравномерная регенерация эпителия, кератоз эпителия, разволокнение соединительной ткани) и опытных препаратах Б (вакуолизация и неравномерная регенерация эпителия, полнокровие тканей). Окраска гематоксилин и эозин, x100.

На 30 день в контрольных препаратах можно было выделить неравномерную регенерацию эпителия, нередко в виде сосочкообразных утолщений, сохранялось разволокнение соединительной ткани как признак продолжающегося отека.

В опытных препаратах наблюдалась равномерная регенерация эпителия. Соединительная ткань собственной пластинки роговицы достаточно компактна без признаков отека (рисунок 3).

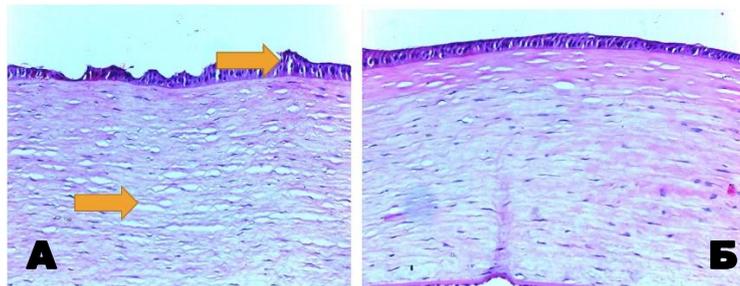


Рисунок 3 – Морфологические изменения на тридцатый день в контрольных А (неравномерная регенерация эпителия, сосочкообразные утолщения, разволокнение соединительной ткани) и опытных препаратах Б (равномерная регенерация эпителия, компактная соединительная ткань собственной пластинки). Окраска гематоксилин и эозин, x100.

Выводы:

1 При использовании терапии стволовыми клетками:

1.1 Процесс восстановления в опытных препаратах с применением стволовых клеток протекает значительно быстрее.

1.2 Регенерация носит равномерный характер (восстановление двуслойного эпителия без полиповидного разрастания).

1.3 Структура основного вещества соединительной ткани роговицы приближается к нормальной.

2 Лечение традиционными методами без применения стволовых клеток сопровождается неравномерной регенерацией и следующими морфологическими изменениями: кератоз и неравномерная эпителизация эпителия, участками гиперплазии эпителия с образованием сосочкоподобных структур, сохраняющееся разволокнение соединительной ткани, как признак её долговременного отека.

3 Таким образом, клеточная терапия с использованием мезенхимальных клеток является одним из методов усиления регенераторных процессов при лечении заболеваний глаза с восстановлением его нормальной структуры.

Литература

1. «Исследование эффективности применения биомедицинского клеточного продукта на основе лимбальных стволовых клеток и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани орбиты глаза и биodeградируемых носителей в клеточной терапии воспалительно-дистрофических поражений роговицы / Л.Н. Марченко, А.Ю. Чекина, М.Ф. Джумова и др. // Научные технологии и техника. – Минск 2016. – С. 36.

2. Araujo, A. L. Corneal stem cells and tissue engineering: Current advances and future perspectives / A. L. de Araujo, J. Á. P. Gomes // World Journal of Stem Cells. – 2015. – № 7. – P. 806–814.

3. Secker G. A. Limbal epithelial stem cells of the cornea / G. A. Secker –StemBook –London, 2009 – P. 22-40.

4. Limbal Stem Cells and Corneal Epithelial Regeneration: Current Status and Prospectives. / L. Yan, D. Jiang, J. He., etc. // Journal of Ocular Biology. – 2014. – № 10. – С. 8-18.