

Н. А. Недзьведь

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ПОРАЖЕНИЙ РОГОВИЦЫ

Научные руководители: канд. мед. наук, доц. С. А. Гузов

Кафедра патологической анатомии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

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

Ключевые слова: роговица, лимбальные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки.

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

Keywords: cornea, limb stem cells, mesenchymal stem cells.

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 или даже к полной слепоте. По данным ВОЗ 5% населения мира страдает от слепоты, связанной с заболеваниями роговицы. 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. Забор производился под внутривенным наркозом,

после чего материал передан сотрудникам Республиканского научного медицинского центре клеточных технологий (РНМЦ) Института биофизики и клеточной инженерии для выделения и культивирования стволовых клеток.

3. Создание экспериментальной модели химического повреждения роговицы кролика. Для этого использовался метод Обенбергера. Щелочной ожог был вызван аппликацией фильтровальной бумаги, смоченной в 2,5% растворе гидроксида натрия, с экспозицией 5 секунд на роговицу под местной анестезией.

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, а также MSB-методом на фибрин.

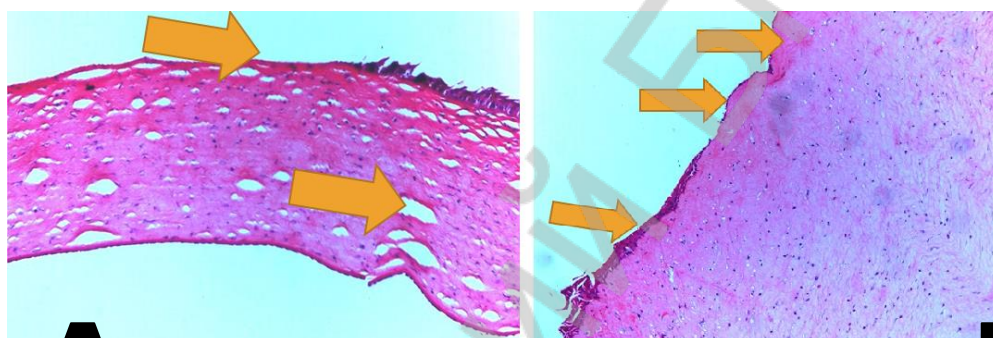
Результаты и их обсуждение. Был произведен морфологический анализ полученных препаратов (таблица 1).

Таблица 1. Морфологические изменения в опытных и контрольных препаратах

	Контроль	Опыт
5 дней	<ul style="list-style-type: none"> —Дефект эпителия роговицы —Гомогенизация базальной мембраны роговицы —Разволокнение соединительной ткани собственной пластинки роговицы 	<ul style="list-style-type: none"> —Неравномерная регенерация многослойного эпителия роговицы —Гомогенизация соединительной ткани собственной пластинки —Воспалительная реакция по периметру поражения
14 дней	<ul style="list-style-type: none"> —Неравномерная регенерация эпителия. —Неравномерное утолщение регенерирующего эпителия. —Очаговый кератоз регенерирующего эпителия. —Разволокнение соединительной ткани, как проявление её отека 	<ul style="list-style-type: none"> —Вакуолизация регенерирующих эпителиальных клеток, неравномерная регенерация эпителия. —Полнокровие соединительной ткани собственной пластинки роговицы. —Эозинофилия соединительной ткани
30 дней	<ul style="list-style-type: none"> —Неравномерная регенерация эпителия в виде сосочкообразных утолщений —Разволокнение соединительной ткани сохраняется 	<ul style="list-style-type: none"> —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).



А **Б**
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).

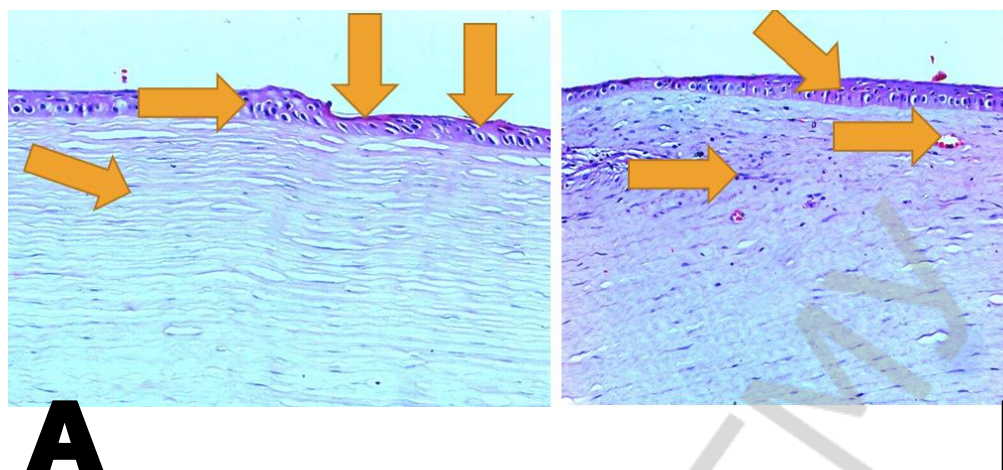


Рисунок 2 – Морфологические изменения на четырнадцатый день в контрольных А (неравномерная регенерация эпителия, кератоз эпителия, разволокнение соединительной ткани) и опытных препаратах Б (вакуолизация и неравномерная регенерация эпителия, полнокровие тканей). Окраска гематоксилин и эозин, x100.

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).

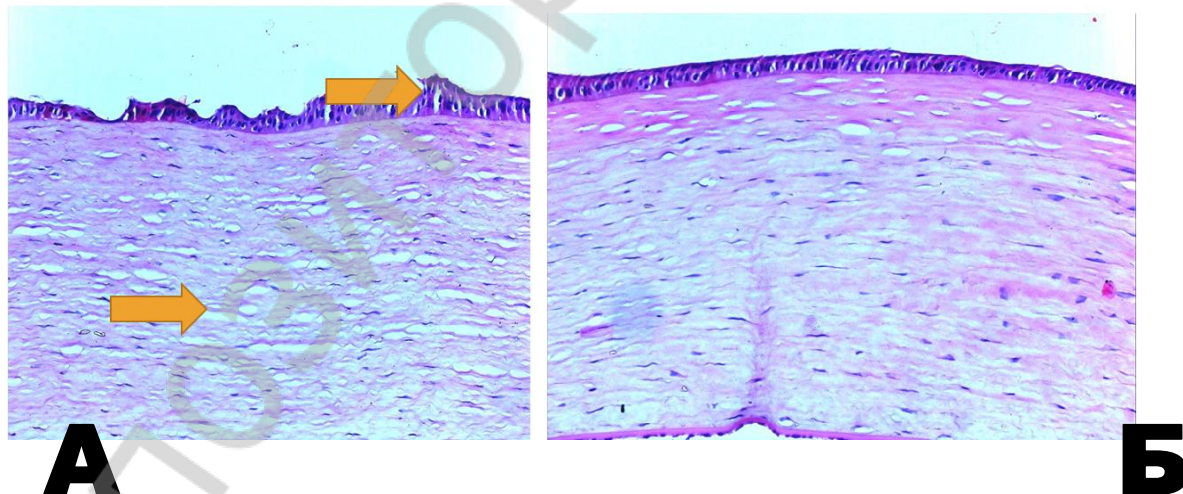


Рисунок 3 – Морфологические изменения на тридцатый день в контрольных А (неравномерная регенерация эпителия, сосочкообразные утолщения, разволокнение соединительной ткани) и опытных препаратах Б (равномерная регенерация эпителия, компактная соединительная ткань собственной пластинки). Окраска гематоксилин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

N. A. Nedzvedz

MORPHOLOGICAL RESULTS OF THE STEM CELLS USAGE IN THE THERAPY OF THE CORNEA DAMAGES

Tutors: associated professor S. A. Gusov

*Department of Pathological Anatomy,
Belarusian State Medical University, Minsk*

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.