

ЗАБОЛЕВАНИЯ РОГОВИЦЫ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ И КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

*¹Марченко Л.Н., ¹Чекина А.Ю., ¹Джумова М.Ф., ¹Далидович А.А.,
¹Бутько Л.В., ²Квачева З.Б., ²Василевич И.Б., ²Волотовский И.Д., ³Панес М.А.*

*¹Учреждение образования «Белорусский государственный
медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

*³Учреждение здравоохранения «3-я городская клиническая больница
имени Е.В. Клумова», г. Минск, Республика Беларусь*

Актуальность. Одним из решений важной проблемы лечения заболеваний роговицы, является применение клеточных технологий: трансплантация аутологичных и аллогенных культивированных мезенхимальных и эпители-

альных стволовых клеток. Показано, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) имеют потенциальную терапевтическую ценность в восстановлении роговицы, так как обладают противовоспалительным и модулирующим ангиогенез роговицы действием, способны подавлять отторжение трансплантата и содействовать заживлению ран роговицы [Повещенко О.В., 2018; Mariana Lizeth Orozco Morales, 2019; Aline Lütz de Araujo, 2015].

В последние годы интенсивные исследования были сфокусированы на лимбальных стволовых клетках в качестве источника регенеративной клеточной терапии роговой оболочки. Область лимба рассматривается как классическое место локализации эпителиальных стволовых клеток лимба роговицы (ЭСКЛ).

В настоящее время разработка клеточных технологий для стимуляции регенерации роговицы является актуальным направлением исследований в области поиска эффективных методов лечения заболеваний роговицы. Одним из важных этапов разработки метода лечения является доклиническое исследование на экспериментальных животных.

Цель. Проанализировать эффективность клеточной терапии животных (кролики) с экспериментальной моделью повреждения роговицы с использованием культивированных стволовых клеток глаза с учетом различных доз клеток, биосовместимости носителя, способов введения для разработки биомедицинского клеточного продукта (БМКП); эффективность регенеративных процессов при воспалительно-дистрофических заболеваниях роговицы у пациентов на основе использования БМКП, включающего аутологичные культивированные эпителиальные стволовые клетки лимба (ЭСКЛ) роговицы и мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани (МСК ЖТ).

Материал и методы. Экспериментальные исследования проводились на 10 кроликах (20 глаз). Предметом исследований явилось исследование состояния роговой оболочки (эпителий, строма) кроликов, конъюнктивальной полости и век при отборе животных и в процессе лечения экспериментального химического ожога роговицы стволовыми клетками. Определены условия проведения клеточной трансплантации у животных, оптимизирующие регенеративные процессы в роговице. Правые глаза (OD) — опытная группа (10 глаз), на которых проводились инъекции МСК ЖТ или ЭСКЛ (500 тыс. клеток или 1млн. клеток) в объеме 0,4 мл физиологического раствора, перилимбально в 5 мм от лимба, в секторе воспроизводимого химического щелочного ожога роговицы II степени.

Клиническое изучение эффективности и безопасности аутологичных ЭСКЛ и МСК ЖТ было проведено на 27 пациентах (27 глаз): 16 мужчин (60%) и 11 женщин (40%) с воспалительно-дистрофическими заболева-

ниями роговицы различной этиологии. Возраст пациентов составил 51,54 (31,0%; 69,0%) года, (Me (25%; 75%)). С целью выделения и накопления биомассы стволовых и прогениторных клеток в условиях культуры предварительно у пациентов производилась эксплантация кератолимбального фрагмента (4×2×1 мм на 12-часовом меридиане) и подкожной жировой клетчатки (5×5×5 мм). Эксплантированный материал помещали в транспортную среду и отправляли в лабораторию для выделения и культивирования ЭСКЛ и МСК ЖТ и наработки биомассы клеток в течение 1–2 пассажей. Морфологию клеток анализировали в период их роста и формирования монослоя с использованием световой и фазово-контрастной микроскопии (Olympus CKX 41, Япония). Фенотип ЭСКЛ определяли с помощью методов проточной цитофлуориметрии и прямого метода флуоресцирующих антител, меченных FITC к маркеру K19 (Abcam, США), антителами к нестину, и к белку p63, меченными Alexa Fluor 488 (R&D Systems, США). Фенотип МСК ЖТ подтверждали с помощью проточной цитофлуориметрии, используя антитела к поверхностным маркерам (CD29, CD44, CD90 и CD105). Клеточные культуры, подготовленные для введения пациентам, в обязательном порядке подвергались типологическому и микробиологическому тестированию и оформлению аналитических паспортов на культуры клеток, регламентирующие их жизнеспособность, принадлежность к определенному фенотипу, стерильность.

Исходя из результатов проведенных ранее экспериментальных исследований на кроликах с моделью ожога роговицы, количество клеток ЭСКЛ или МСК ЖТ, которые вызвали выраженный терапевтический эффект, способствующий быстрой эпителизации роговой оболочки, составил 500 тыс. клеток в 0,1 мл физиологического раствора. На конечной стадии получения БМКП клетки суспендировали в растворе натрия хлорида 0,9% для инфузий из расчета 500 тыс. клеток в 0,4 мл.

У 8 пациентов локальная перилимбальной инъекции была выполнена однократно, у 14 пациентов — дважды, у 2 — трижды, у 3 — четырежды. При необходимости повторное введение СК выполнялось с интервалом от 2 недель до 3 месяцев. Всего — 54 инъекции: ЭСКЛ — 10 инъекций; МСК ЖТ — 44 инъекции.

Результаты. Динамику регенеративного процесса в роговой оболочке глаза после перилимбального введения БМКП оценивали по срокам эпителизации изъязвлений роговицы с использованием красящей пробы с флуоресцеином.

Улучшение остроты зрения наблюдалось как в раннем периоде (1–3 мес. после клеточной трансплантации) в 81,8% случаев, так и в позднем посттрансплантационном периоде (через 3 мес. и больше, после введения СК)

в 87,5% случаев. Более высокая острота зрения в позднем посттрансплантационном периоде объясняется проведением не только клеточной терапии, но и хирургических операций (послойная или сквозная пересадки роговицы, удаления осложненной катаракты; лазерной дисцизии задней капсулы хрусталика).

Не выявлено достоверной разницы между используемыми типами стволовых клеток (эпителиальными или мезенхимальными) и показателями остроты зрения в ранний и поздний периоды наблюдения после лечения: ЭСКЛ – МСК ($p>0,05$); ЭСКЛ – ЭСКЛ+МСК ($p>0,05$); МСК – ЭСКЛ+МСК ($p>0,05$).

После проведения клеточной терапии выраженный терапевтический эффект наблюдался у пациентов с эпителиальной дистрофией роговицы и кератитами. По данным ОКТ Visante отмечалось уменьшение толщины и отека роговицы ($p<0,05$), просветление стромы роговицы и повышение остроты зрения ($p<0,05$). При периферических язвенных кератитах, возникающих на фоне системных аутоиммунных заболеваний, перилимбальные инъекции МСК ЖТ или ЭСКЛ способствовали быстрой эпителизации роговицы, исчезновению роговичного синдрома на первые и вторые сутки после инъекции СК. При этом толщина роговицы в оптической зоне не изменялась.

При эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы, выраженном кератоконусе, перилимбальная клеточная терапия давала временный терапевтический эффект (1–2 месяца). Данным пациентам (5 человек) была проведена сквозная (4 пациента) и послойная (1 пациент) пересадка роговицы. В послеоперационный период всем пациентам ежемесячно в течение 3 месяцев выполнялись перилимбальные инъекции аутологичных стволовых клеток (СК). Проводимая клеточная терапия способствовала прозрачному приживлению роговичного трансплантата, уменьшению воспалительных процессов, повышению остроты зрения (срок наблюдения от 2 до 3 лет).

Выводы. Перилимбальная клеточная терапия аутологичными эпителиальными стволовыми клетками лимба (ЭСКЛ) и аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани (МСК ЖТ) является эффективным и безопасным методом лечения воспалительно-дистрофических заболеваний роговицы.

Применение стволовых клеток из мезенхимальной ткани является перспективным за счет возможности получения материала в достаточном количестве от самого реципиента.

В процессе лечения и динамического наблюдения не зарегистрировано каких-либо осложнений со стороны органа зрения, а также системного побочного действия, что свидетельствует о биобезопасности локальной клеточной аутотрансплантации.