

БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 611.841.2:611.013.83

КОНСЕРВИРОВАННАЯ АМНИОТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА В СТРУКТУРЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО КОМПЛЕКСА ПЕРЕДНЕГО ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО СЛОЯ РОГОВИЦЫ

Е.С. Милюдин^{1,2}, К.Е. Кучук^{1,2}, О.В. Братко²*

¹*Самарский государственный медицинский университет,*

²*Самарская областная офтальмологическая больница им. Т.И. Ерошевского, Россия*

PRESERVED AMNIOTIC MEMBRANE IN TISSUE-ENGINEERING COMPLEX STRUCTURE OF ANTERIOR EPITHELIAL CORNEAL LAYER

E.S. Milyudin^{1,2}, K.E. Kuchuk^{1,2}, O.V. Bratko²*

¹*Samara State Medical University,*

²*Samara Regional Ophthalmological Hospital named after T.I. Eroshevsky, Russian Federation*

Цель. В эксперименте изучить возможность культивирования на поверхности силиковосушенной пластифицированной амниотической мембраны «Флексамер» клеток переднего эпителия роговицы.

Материалы и методы. Выполнено гистологическое исследование консервированной силиковосушиванием и дополнительно подвергнутой стерилизации гамма-лучами амниотической мембраны «Флексамер». Культивированные клетки переднего роговичного эпителия осаждались на поверхность биоматериала «Флексамер». Была выполнена морфологическая оценка качества фиксации и биотоксичности силиковосушенной пластифицированной амниотической мембраны «Флексамер».

Результаты. Характерной особенностью биоматериала «Флексамер» является минимальное повреждение структуры эпителиального слоя, несмотря на явную нежизнеспособность клеток. Кроме того, для исследуемой ткани характерна хорошая сохранность всех остальных слоев амниотической мембраны.

Культивированные клетки переднего эпителия роговицы, осажженные на поверхности силиковосушенной пластифицированной амниотической мембраны «Флексамер», образовывали колонии и продолжали пролиферировать. К 10–12-м суткам формировался 2–3-й слой эпителиальных клеток. К данному сроку клетки приобретали многоугольную форму и более типичный для роговичного эпителия ядерно-цитоплазменный индекс.

Выводы. Выполненное экспериментальное исследование подтверждает сохранность биологически активных веществ, находящихся большей частью в эпителиальном слое амниона после его высушивания над си-

© Милюдин Е.С., Кучук К.Е., Братко О.В., 2016

тел. 8 (846) 323 00 13

e-mail: miljudin@mail.ru

[Милюдин Е.С. (*контактное лицо) – доктор медицинских наук, заместитель директора; Кучук К.Е. – врач-офтальмолог, врач-исследователь; Братко О.В. – кандидат медицинских наук, заведующая отделением].

ликагелем. Хорошая фиксация культивированных клеток, отсутствие цитотоксичности позволяют сделать заключение о возможности применения биоматериала «Флексамер» в качестве подложки при создании тканеинженерного комплекса с использованием клеток переднего эпителия роговицы.

Ключевые слова. Эпителий роговицы, культивирование эпителиальных клеток, амниотическая мембрана.

Aim. To carry out experiment study of the possibility of cultivation of anterior corneal epithelial cells on the surface of silico-dried plasticized amniotic membrane “Flexamer”.

Materials and methods. Histological study of amniotic membrane “Flexamer”, preserved by silico-drying and additionally sterilized by gamma rays, was conducted. The cultivated cells of the anterior corneal epithelium were precipitated on the surface of biomaterial “Flexamer”. Morphological assessment of the quality of fixation and biotoxicity of silico-dried plasticized amniotic membrane “Flexamer” was fulfilled.

Results. A typical peculiar feature of biomaterial “Flexamer” is a minimum damage of the structure of epithelial layer, despite obvious cell viability. The studied tissue is also characterized by a good safety of all the rest layers of the amniotic membrane. The cultivated anterior corneal epithelium cells, precipitated on the surface of silico-dried plasticized amniotic membrane “Flexamer”, formed colonies and continued to proliferate. By the days 10-12, the second – third layer of epithelial cells was formed. By this time, the cells acquire a polygonal form and a nuclear-cytoplasmic index, more typical for the corneal epithelium.

Conclusions. The conducted experimental study confirms safety of biologically active substances, which are concentrated mostly in the epithelial layer of amnion after its drying over the silica gel. Good fixation of cultivated cells, absence of cytotoxicity allow to make a conclusion about the possibility of applying biomaterial “Flexamer” as a substrate for formation of tissue-engineering complex with use of anterior corneal epithelial cells.

Key words. Corneal epithelium, cultivation of epithelial cells, amniotic membrane.

ВВЕДЕНИЕ

Ряд патологических состояний роговицы можно классифицировать как заболевания, связанные с недостаточностью стволовых клеток переднего эпителия роговицы. По этиологическим факторам развития патологическая недостаточность лимбальных клеток может быть обусловлена двумя вариантами: в 1-м варианте повреждаются непосредственно камбиальные клетки; во 2-м происходят нарушение нейротрофического обеспечения зоны лимба и опосредованная гибель камбиальных клеток. Во всех случаях дефекты эпителиального покрова способствуют изменению прозрачности, врастанию сосудов в поверхностные слои стромы и инвазии конъюнктивального эпителия.

Независимо от этиологических факторов, приведших к развитию патологии роговичного эпителия, принципы диагностики и

лечения данного заболевания одинаковы. Прежде всего это активация пролиферативной активности лимбальных клеток фармакологическими и физиотерапевтическими средствами. При значительных дефектах активации камбиальных клеток по краям раны недостаточно для обеспечения восстановительных процессов, по этой причине некоторыми авторами предлагается трансплантация культивированных аллогенных фибробластов [14]. Замещение глубоких дефектов стромы аллогенными фибробластами позволяет добиться полного восстановления дефекта с формированием плотного бессосудистого помутнения [8]. Однако наряду с быстрым восстановлением стромы и эпителия роговой оболочки авторами отмечается сохранение вероятности развития неоваскуляризации [3, 8].

Наиболее эффективным методом лечения дефектов эпителиального слоя, вызван-

ных патологией зоны лимба, является трансплантация участков здоровой ткани с парного глаза либо донорской ткани. Однако современные потребности в трансплантации роговицы существенно ограничиваются нехваткой донорских тканей, а прогнозы свидетельствуют о том, что потребность в донорских материалах будет увеличиваться [1, 4]. Следовательно, актуальной остается задача разработки альтернативных способов компенсации или замены поврежденных или утраченных жизненно важных функций органов и тканей. В связи с этим в последние годы основной акцент сделан на использование технологий тканевой инженерии – разработку биоискусственных тканей, наделенных структурой и функцией биологических тканей [9].

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 для культивирования эпителия *ex vivo*, таких как гидрогель, коллагеновые матрицы, фибрин и т.д. [5, 11, 15].

Некоторые авторы использовали фибриновый субстрат для культивирования лимбальных эпителиальных клеток, взятых с контрлатерального здорового глаза. Они трансплантировали полученные клетки и получили хороший результат – эпителизацию в течение первой недели. Поскольку фибриновый гель впоследствии абсорбируется, возможна трансплантация клеток на субстрате непосредственно на роговицу [3, 5].

Эффективность клинического использования культивированных клеток во многом зависит от метода доставки на поверхность роговицы. Амниотическая мембрана обладает всеми необходимыми свойствами

биологической подложки. Прежде всего в структуре аниона так же, как и в структуре роговицы, содержится коллаген I, III, IV, V и VII типов, ламинин, фибронектин. K. Fukuda et al. в 1999 г. доказали схожесть структуры ламинина-1,-5, фибронектина и коллагена VII типа в базальных мембранах конъюнктивы, роговицы и амниотической мембраны, что объясняет высокую способность амниона к биоинтеграции в ткани глаза [12].

Учитывая ограниченные возможности применения в качестве подложки нативного амниона, многие авторы рассматривают эффективность использования консервированной различными методами амниотической мембраны. Исследования подтвердили наличие цитокинов и факторов роста в базальной мембране, консервированной без сохранения жизнеспособных клеток эпителия амниотической мембраны [10, 13].

Анализ результатов исследований позволил нам предположить возможность применения в качестве подложки для культивированных клеток эпителия роговицы силиковысушенную пластифицированную амниотическую мембрану «Флексамер» [6].

Цель исследования – в эксперименте изучить возможность культивирования на поверхности силиковысушенной пластифицированной амниотической мембраны «Флексамер» клеток переднего эпителия роговицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнено исследование 18 тотальных плоскостных образцов консервированной силиковысушиванием и дополнительно подвергнутой стерилизации гамма-лучами амниотической мембраны «Флексамер». Приго-

товленные парафиновые срезы окрашивались гематоксилин-эозином по методу Маллори, по Ван Гизону гематоксилином Вейгерта и исследовались под световым микроскопом. Подсчет клеток и морфометрия осуществлялись в 10–23 полях зрения.

Забор клеточного материала проводили путем иссечения лимбальной зоны диаметром до 2 мм и толщиной до 200 мкм при выполнении энуклеации у больных с новообразованиями заднего отрезка глазного яблока. Далее из полученного материала в лаборатории культивации клеточных культур НИИ «Институт экспериментальной медицины и биотехнологий» Самарского государственного медицинского университета выделялись унипотентные (камбиальные) стволовые клетки роговичного эпителия и выполнялось их культивирование. Клетки выращивались в пластиковых культуральных флаконах фирмы «Costar» объемом 50 мл в среде MEM (Modified Eagle's Medium) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 5 мг/л глутамина, 5 мг/л инсулина. Культивированные клетки эпителиоцитов в количестве не менее 50 на мм² осаждались на эпителиальную поверхность силиковысушенной пластифицированной амниотической мембраны в один слой. Комплексы биоматериала и клеток продолжали культивирование в термостате при $t = 37$ °С. В последующем выполнялось морфологическое исследование тканеинженерного комплекса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время доказанным является тот факт, что консервированная амниотическая мембрана, в отличие от «свежей», представляет собой инертную ткань, не содер-

жащую живых клеток [13]. Способности консервированной амниотической мембраны влиять на процессы репарации обусловлены главным образом изменением локальной среды при помощи факторов роста и цитокинов, локализующихся в эпителиальных клетках, поэтому при консервации амниона особое внимание уделяют сохранению морфологии эпителия. По этой причине нами прежде всего было проведено исследование гистологических препаратов силиковысушенной пластифицированной амниотической мембраны «Флексамер».

Эпителиальные клетки выглядят уплощенными, с гомогенной оксифильной цитоплазмой. Большинство ядер палочковидной или овальной формы, с грубыми глыбками хроматина. В некоторых клетках можно наблюдать пикноз ядер, кое-где обнаруживаются околядерные вакуоли. Ядра в таких клетках изменены – неправильной формы, поверхность неровная, с вмятинами и выступами. На единичных участках клетки лишены ядер. Характерной особенностью изучаемой ткани является минимальное повреждение структуры эпителиального слоя, несмотря на явную нежизнеспособность клеток (рис. 1).



Рис. 1. Структура эпителиального слоя

Для исследуемой ткани также характерна хорошая сохранность всех остальных слоев амниотической мембраны. Базальная мембрана хорошо контурирует. Компактный слой выглядит как гомогенная оксифильная

полоса. В соединительно-тканной части наблюдается резкое уменьшение количества клеточных элементов. Нередко видны тени ядер. Ядра сохранившихся фибробластов имеют палочковидную форму. Сами клетки резко уплощены. Количество макрофагальных элементов тоже уменьшено, однако мы наблюдали наряду с уплощенными клетками Кащенко–Гофбауэра нормальные неизменные клетки. В этой зоне можно видеть продольно расположенные волокна и участки гомогенного оксифильного прокрашивания. Спонгиозный слой представляется более рыхлым, чем ранее описанный. В нем видны рыхло расположенные пучки извитых волокон, проявляющих слабую оксифилию. Между пучками волокон встречаются единичные фибробласты. Четкой границы между этими двумя слоями (слой фибробластов и спонгиозный) проследить не удается.

Следовательно, наряду с достаточно хорошим сохранением структуры, клеточного состава амниона, подвергнутого силиковысушиванию, нужно отметить нежизнеспособность клеток его эпителия, фибробластов и уменьшение количества клеток во всех слоях. Однако в связи с сохранением структуры клеток и плотной связи клеточных мембран эпителия с подлежащим слоем можно предположить сохранение определенных свойств силиковысушенной пластифицированной амниотической мембраны «Флексамер», характерных только для амниотической мембраны с жизнеспособным эпителиальным слоем.

Результаты гистологического исследования обосновали возможность использования силиковысушенной пластифицированной амниотической мембраны «Флексамер» в качестве подложки для культивированных клеток переднего эпителия роговицы при

создания трехмерного тканеинженерного комплекса.

На втором этапе экспериментального исследования были получены стволовые клетки роговичного эпителия из лимбальной зоны, культивированные в стандартных условиях (рис. 2). В последующем культивированные клетки переднего эпителия роговицы осаждались на поверхности силиковысушенной пластифицированной амниотической мембраны «Флексамер», образовывали колонии и продолжали пролиферировать (рис. 3).

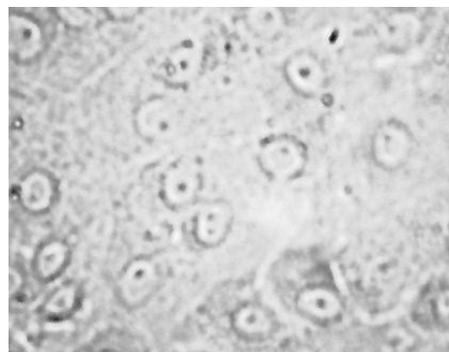


Рис. 2. Стволовые клетки роговичного эпителия из лимбальной зоны, культивированные в стандартных условиях



Рис. 3. Клетки переднего эпителия роговицы на поверхности мембраны «Флексамер»

К 10–12-м суткам формировался 2–3-й слой эпителиальных клеток. К данному сроку клетки приобретают многоугольную форму

и более типичный для роговичного эпителия ядерно-цитоплазмальный индекс. Хорошая адгезия и продолжающийся рост эпителиальных клеток, отсутствие признаков цитотоксичности и специализация после пересева культивированных эпителиоцитов на силиковысушенную пластифицированную амниотическую оболочку «Флексамер» позволяют утверждать о сохранности биологически активных свойств амниона после его консервации путем высушивания над силикагелем с пластификаторами.

Выводы

Характерной особенностью силиковысушивания являются минимальные по сравнению с другими методами сушки изменения структуры высушиваемого материала и более низкие температуры высушивания. Наше экспериментальное исследование подтверждает сохранность биологически активных веществ, находящихся большей частью в эпителиальном слое амниона, после высушивания над силикагелем.

Хорошая фиксация культивированных клеток, отсутствие цитотоксичности и специализация клеток при дальнейшем культивировании позволяют сделать заключение о возможности применения силиковысушенной пластифицированной амниотической мембраны «Флексамер» в качестве подложки при создании тканеинженерного комплекса с использованием клеток переднего эпителия роговицы.

Библиографический список

1. Борзенко С.А., Комах Ю.А. Законодательные и нормативно-правовые аспекты в деятельности глазных тканевых банков Рос-

сии. Сб. тез. докл. VIII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Федоровские чтения – 2009». М. 2009; 535–536.

2. Васильев А.В., Макаров П.В., Роговая О.С., Гундорова Р.А., Терских В.В. Восстановление дефектов роговицы с помощью тканевой инженерии. Известия Российской академии наук. Серия биологическая 2005; 1: 5–8.

3. Канюков В.Н., Стадников А.А., Трубина О.М., Яхина О.М. Применение наноструктурированного биопластического материала при травматических повреждениях роговицы. Вестник офтальмологии 2015; 1: 43–49.

4. Комах Ю.А., Мороз З.И., Борзенко С.А. Современное состояние проблемы повторной пересадки роговицы (обзор литературы). Офтальмохирургия 1997; 1: 19–27.

5. Макаров П.В., Гундорова Р.А., Чернетский И.С., Оганесян О.Г. Лимбальная трансплантация в хирургической реабилитации пациентов, перенесших тяжелые ожоги глаз. Вестник офтальмологии 2007; 3: 9–12.

6. Милюдин Е.С. Эффективность использования силиковысушенной амниотической мембраны. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Новые технологии в лечении заболеваний роговицы». М. 2004; 473–479.

7. Мороз З.И. Современные направления хирургического лечения патологии роговицы. Съезд офтальмологов России, 9-й: тез. докл. М. 2010; 298–299.

8. Ходжабежан Г.В. Трансплантация аллогенных культивированных клеток в лечении ожоговых дефектов роговицы в эксперименте: дис. ... канд. мед. наук М. 2003; 192.

9. Atala A., Lanza R., Thompson J., Nerem R. Principles of regenerative medicine. Academic Press is an imprint of Elsevier. First ed. 2008; 1472.

10. *Dietrich-Ntoukas T., Hofmann-Rummelt C., Kruse F.E., Schlötzer-Schrebarth U.* Comparative analysis of the basement membrane composition of the human limbus epithelium and amniotic membrane epithelium. *Cornea* 2012; 31 (5): 564–569.
11. *Friend J., Kinoshita S., Thoft R.A., Eliason J.A.* Corneal epithelial cell cultures on stromal carriers. *Investigative Ophthalmology Visual Science* 1982; 23: 41–49.
12. *Fukuda K., Chikama T., Nakamura M., Nishida T.* Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea* 1999; 18: 73–79.
13. *Grueterich M., Tseng S.C.* Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex-vivo. *Archives of Ophthalmology* 2002; 120: 783–90.
14. *Koizumi N., Inatomi T., Sotozono C., et al.* Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current Eye Research* 2000; 20: 173–177.
15. *Minami Y., Sugibara H., Oono S.* Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Investigative Ophthalmology Visual Science* 1993; 34: 2316–2324.
16. *Wilson S.E., Liu J.J., Mohan R.R.* Stromal epithelial interactions in the cornea. *Progress in Retinal and Eye Research* 1999; 18: 239–309.

Материал поступил в редакцию 07.07.2016