

УДК 611.841.2.018.7

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ НЕДОСТАТОЧНОСТИ РЕГИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РОГОВИЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ

© 2006 Е.С. Милюдин¹

Разработана экспериментальная модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия без механического повреждения зоны лимба. Эксперименты были выполнены на двух группах животных. Животным экспериментальной группы после удаления эпителия роговицы выполнялась аппликация 0,04 % ММС на область лимба. В контрольной группе быстрее заканчивались эпителизация и воспалительная реакция. У животных экспериментальной группы на поверхности роговицы формировались помутнение и врастание сосудов. Морфологически подтверждено развитие на поверхности роговой оболочки конъюнктивального эпителия.

Передний роговичный эпителий представлен 5–6 слоями, выполняет важные функции по сохранению непрерывности слезной пленки, восстановлению эпителиального покрова после потери клеток. При значительном повреждении дефект эпителиального покрова замещается путем центростремительного движения отдельных клеток. При этом новые эпителиальные клетки образуются путем деления камбиальных клеток, расположенных в области лимба [1–3]. В области лимба располагаются так называемые региональные стволовые клетки (камбиальные клетки) роговичного эпителия. При органной недостаточности региональные стволовые клетки способны к миграции в область поражения. Региональные стволовые клетки взрослого организма истощаются по мере старения организма [4, 5].

Патологические состояния поверхности роговой оболочки, характеризующиеся врастанием конъюнктивы, васкуляризацией, хроническим или рецидивирующим кератитом, чаще всего обусловлены дисфункцией или недостаточностью камбиальных клеток лимба. Имеющиеся методы лечебного воздействия на региональные стволовые клетки эпителия роговицы не всегда достаточно эффективны. Следовательно, необходимо разрабатывать новые и совершенствовать старые способы лечения. Для изучения репаративных свойств и эффективности новых методов лечебного воздействия предлагались различные экспериментальные модели формирования недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия. В частности, оказывалось кольцевидное воздействие электрокоагулятором [6], либо после тотального механического удаления эпителия роговицы осуществлялась тотальная хирургическая резекция лимбальной зоны [7].

¹Милюдин Евгений Сергеевич (miljudin@mail.ru), Центральная научно-исследовательская лаборатория Самарского государственного медицинского университета, 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

1. Цель работы

Разработать экспериментальную модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия без механического повреждения зоны лимба.

2. Материал и методы исследования

При разработке данной модели были проведены эксперименты на двух группах животных:

1 группа, экспериментальная — 15 кроликов; 2 группа, контрольная — 8 кроликов. Животным как экспериментальной, так и контрольной групп после иссечения третьего века удалялся роговичный эпителий путем аппликации диска фильтровальной бумаги диаметром 10 мм, пропитанного 20% раствором этилового спирта, на 15–20 секунд. Некротизированные клетки эпителия удалялись с поверхности роговицы микротупфером. Контроль удаления роговичного эпителия производился путем окрашивания поверхности роговицы 1% раствором флюоресцеина. В последующем животным экспериментальной группы на область лимба выполнялась аппликация 0,04% раствора митомицина-С (ММС) в течение 4 минут. Как известно, раствор митомицина-С достоверно угнетает процесс деления клеток [8]. Экспозиция воздействия препарата значительно была увеличена для достоверного угнетения камбиальных клеток роговичного эпителия.

Наблюдение за состоянием глаз животных осуществляли с помощью фокального освещения и биомикроскопии щелевой лампой "Reichert" — XCEL 200. Проводилась флюоресцеиновая проба с фоторегистрацией. Хирургические операции выполнялись с использованием операционного микроскопа "Leica M651". Клиническую оценку состояния глаз животных проводили по следующим признакам: степень воспалительной реакции, площадь дефекта эпителия, интенсивность помутнения и степень васкуляризации роговицы.

По окончании срока наблюдения животных выводили из эксперимента под наркозом методом воздушной эмболии через ушную артерию. Материал для морфологического исследования забирался на 3, 7 сутки. Для проведения дальнейших морфологических исследований проводили энуклеацию глазных яблок по обычной хирургической методике. Глаза фиксировались в 12% нейтральном растворе формалина, проводились через батарею спиртов и заливались в целлоидин. Выполнялось не менее 500 срезов с различных участков переднего отдела каждого глазного яблока. Каждый десятый срез окрашивался гематоксилин-эозином по Ван Гизону. Изучение микропрепаратов производилось с использованием светового микроскопа.

С целью определения степени значимости воспалительной реакции на регенерацию роговичного эпителия было выполнено исследование количества фибробластов и полиморфно-ядерных клеток. Подсчет производился в 10 полях 10 препаратов роговицы экспериментальной и контрольной групп животных в сравнении с количеством фибробластов и полиморфно-ядерных клеток в интактной роговице.

Полученные результаты обработаны статистическими методами. Прежде всего, определялись средние значения, выполнялся дисперсионный анализ для выявления критериев значимости различий между полученными данными. Для уменьшения риска ошибочно принять нулевую гипотезу нами был применен расчет значения критерия Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони при 5% вероятности ошибки.

3. Результаты и их обсуждение

У животных экспериментальной группы в послеоперационном периоде перфорации роговицы, некроза склеры не наблюдалось. Дефект эпителия сохранялся в течение 5–7 суток после операции. Эпителизация заканчивалась к седьмым суткам, по завершении эпителизации формировалось поверхностное, нежное помутнение роговицы.

В контрольной группе животных глаза очень быстро успокаивались. Эпителизация заканчивалась к третьим–четвертым суткам, помутнения и вставания сосудов в роговицу не наблюдалось. Роговица сохраняла прозрачность, сферичность и зеркальность.

Морфологическая картина в экспериментальной и контрольной группах на 3 сутки после удаления эпителиального слоя.

На гистологических препаратах роговой оболочки животных контрольной группы эпителиальный слой восстанавливается. Площадь эпителизации не менее 80%. Клетки эпителия дифференцированные, располагаются в 4 ряда, ближе к центральной зоне эпителиоциты располагаются в 2 ряда. В строме роговицы отмечается воспалительная реакция, которая проявляется миграцией в слои роговицы полиморфно-ядерных лейкоцитов, более выраженная на периферии, и уменьшением числа фибробластов (рис. 1).

При исследовании гистологических препаратов роговой оболочки в экспериментальной группе, на 3 сутки после деэпителизации и воздействия ММС на камбиальные клетки роговичного эпителия, отмечается наличие эпителия только по периферии, дефект эпителия занимает более 70% площади роговичного диска. Имеющиеся эпителиальные клетки были не дифференцированы, располагались в 1–2 ряда. Формирующийся эпителиальный слой напирал на роговицу в виде вала с периферии. В передней части стромы отмечается уменьшение количества фибробластов (рис. 2). Воспалительная реакция на препаратах экспериментальной группы была незначительной и проявлялась в виде миграции полиморфно-ядерных лейкоцитов на крайнюю периферию роговичного диска.

Морфологическая картина на гистологических препаратах через семь суток после деэпителизации у животных контрольной группы ничем не отличалась от нормальной. Поверхность роговицы покрыта многослойным плоским эпителием. Боуменова мембрана сохранена на всем протяжении, равномерна по толщине. В поверхностных слоях стромы наблюдаются единичные фибробласты.

Исследование гистологических препаратов роговичных дисков животных экспериментальной группы на 7 сутки после деэпителизации и воздействия ММС установило полную эпителизацию роговичного диска, эпителиальные клетки располагаются в 5 и более рядов. Однако необходимо отметить несколько не характерную для эпителия роговой оболочки форму клеток, большое количество базальных клеток цилиндрической формы с плоскими ядрами. К данному сроку отмечается практически полное угасание воспалительных явлений, что проявляется значительным уменьшением числа полиморфноядерных лейкоцитов в поверхностных слоях стромы и нормализацией количества фибробластов (рис. 3).

Следовательно, можно сделать вывод о формировании у животных экспериментальной группы на поверхности роговицы эпителия, характерного для конъюнктивы, т.е. конъюнктивизации.

Исходя из предположения, что повреждение эпителиального слоя путем воздействия 20% спиртом с последующей аппликацией ММС может вызвать более

сильную ответную реакцию, нами определялась степень выраженности асептического воспаления. В зависимости от сроков с момента начала эксперимента нами были обнаружены клетки, характерные для данной стадии воспаления. Асептическое воспаление, вызванное повреждением при удалении эпителия с поверхности роговицы, характеризуется на ранних этапах инфильтрацией полиморфно-ядерными лейкоцитами. В более поздних стадиях воспаления в препаратах обнаружены фибробласты. Наличие данных клеток характерно для стадии пролиферации и обеспечивается размножением и дифференциацией камбиальных мезенхимальных клеток в фибробласты.

В микропрепаратах роговиц животных экспериментальной группы на 3 сутки после начала эксперимента обследовано по 11 полей зрения, выявили в среднем $1,09 \pm 0,2$ полиморфно-ядерных лейкоцитов. В контрольной группе животных количество полиморфно-ядерных лейкоцитов значительно варьируется. На микропрепаратах роговой оболочки, где деэпителизация выполнялась воздействием 20% спирта, наблюдалось $0,9 \pm 0,16$ полиморфно-ядерных лейкоцитов, на препаратах после механической деэпителизации выявлено $1,54 \pm 0,34$ полиморфно-ядерных лейкоцитов. Полученные результаты позволяют предположить некоторое усиление воспалительной реакции при удалении эпителия механическим путем. Для подтверждения данного предположения данные были статистически обработаны. Выполнен дисперсионный анализ для выявления критериев значимости различий между полученными данными (табл. 1).

Таблица 1

**Однофакторный дисперсионный анализ количества
полиморфно-ядерных лейкоцитов в поле зрения микропрепаратов
роговой оболочки на 3 сутки после деэпителизации**

Итоги						
Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия		
Механическая деэпителизация	11	17	1,545	1,272		
Деэпителизация 20% эт.спирт	11	10	0,909	0,290		
Деэпителизация 20% эт.спирт+ММС	11	12	1,090	0,490		
Дисперсионный анализ						
Источник вариации	SS	df	MS	F	P-значение	F критич
Между группами	2,363	2	1,181	1,725	0,195	3,315
Внутри групп	20,545	30	0,684			
Итого	22,909	32				
Итого	38,727	43				

Результаты вычислений полученных в эксперименте данных о количестве полиморфно-ядерных лейкоцитов не противоречат нулевой гипотезе, т.е. нет оснований считать, что метод деэпителизации и дополнительного воздействия ММС суще-

ственно влияет на степень выраженности воспалительной реакции. Для уменьшения риска ошибочно принять нулевую гипотезу нами был применен расчет значения критерия Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони при 5% вероятности ошибки (табл. 2), который подтвердил незначительное влияние на степень выраженности воспалительной реакции метода дезэпителизации.

Таблица 2

**Расчет критерия Стьюдента для множественных сравнений
с поправкой Бонферрони**

Сравнение методов воздействия на эпителий	Разность средних	t	$P \leq 0,05$
Воздействие спиртом+ММС — механическая дезэпителизация	$1,545 - 1,091 = 0,454$	1,803	Нет
Воздействие спиртом — механическая дезэпителизация	$1,545 - 0,9091 = 0,636$		Нет
Воздействие спиртом+ММС — Воздействие спиртом	$1,091 - 0,9091 = 0,181$		Нет

Примечание: число степеней свободы равно 30

Изучение микропрепаратов роговой оболочки, изготовленных на 7 сутки после начала эксперимента, позволило выявить развитие следующей стадии воспалительной реакции — стадии пролиферации. Данная стадия характеризуется преобладанием в клеточном составе фибробластов, наличие которых также варьируется в микропрепаратах роговицы экспериментальной и контрольной группы. В микропрепаратах роговой оболочки экспериментальной групп наблюдалось в среднем $1,63 \pm 0,27$ фибробластов. При исследовании микропрепаратов роговой оболочки контрольной группы на глазах где дезэпителизация выполнялась воздействием 20% этилового спирта, наблюдалось $3 \pm 0,23$ фибробласта, на препаратах после механической дезэпителизации выявлено $1,27 \pm 0,19$ фибробластов. Учитывая, что стадия пролиферации является завершающей стадией асептического воспаления, нами для сравнительного исследования были изготовлены микропрепараты интактной роговой оболочки двух кроликов одинакового возраста и веса с экспериментальными животными. Таким образом, для данной стадии эксперимента осуществлен двойной контроль. При подсчете клеток в интактной роговице обнаружено в среднем $3,8 \pm 0,29$ фибробластов в поле зрения. Предварительная оценка полученных данных позволяет предположить, что воздействие на роговичный эпителий 20% этиловым спиртом вызывает менее выраженное асептическое воспаление, которое купируется быстрее, чем воспалительная реакция после механического удаления эпителия, или комбинированного воздействия на эпителий 20% этиловым спиртом и на лимбальные клетки ММС данного предположения была выполнена оценка статистической значимости различий (табл. 3).

Результаты вычислений критерия значимости различий количества фибробластов в микропрепаратах позволяют отвергнуть нулевую гипотезу, т.е. различия значимы. При более детальном исследовании, сравнении подсчетов количества фибробластов в препаратах интактной роговой оболочки с количеством фибробластов в препаратах экспериментальной и контрольной групп путем вычисления критерия Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони, была подтверждена статистическая значимость различий полученных результатов (табл. 4).

Таблица 3

Однофакторный дисперсионный анализ количества фибробластов в поле зрения микропрепаратов роговой оболочки на 7 сутки после дезэпителизации

Итоги						
Группы	Счет	Сумма	Среднее	Дисперсия		
Нативная роговица	11	42	3,818	0,963		
Механическое удаление эпителия	11	14	1,272	0,418		
Удаление эпителия 20% этиловым спиртом	11	33	3	0,6		
Удаление эпителия 20% этиловым спиртом+ММС	11	18	1,636	0,854		
Дисперсионный анализ						
Источник вариации	SS	df	MS	F	P-значение	F критич
Между группами	46,431	3	15,477	21,826	1,55 ⁻⁰⁸	2,838
Внутри групп	28,363	40	0,709			
Итого	74,795	43				
Итого	107,345	54				

Таблица 4

Расчет критерия Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони

Сравнение методов воздействия на эпителий	Разность средних	<i>t</i>	$P \leq 0,05$
Воздействие спиртом+ММС — интактная роговица	$1,636 - 3,818 = -2,182$	5,869	Да
Воздействие спиртом — интактная роговица	$3 - 3,818 = -0,8182$	2,201	Нет
Механическое воздействие — интактная роговица	$1,273 - 3,818 = -2,545$	6,848	Да

Примечание: число степеней свободы 40

Следовательно, наше предположение о значительно более выраженной воспалительной реакции после выполнения механической дезэпителизации подтверждается. Наименьшее повреждающее действие оказывает дезэпителизация аппликацией

20% этилового спирта. Дополнительное применение ММС усиливает асептическое воспаление в строме роговой оболочки, но менее, чем механическое повреждение эпителия.

Заключение

Таким образом, локальная аппликация 0,04% митомицина-С не приводит к нарушению соединительнотканной структуры роговой оболочки и не нарушает стадийность физиологического ответа на травму роговицы. Асептическое воспаление завершается в обычные сроки и менее выражено, чем при механическом воздействии на эпителий роговой оболочки. Однако воздействие ММС на камбиальные клетки роговичного эпителия блокирует их способность к размножению, что приводит к покрытию роговой оболочки конъюнктивальным эпителием.

Полученные в эксперименте клинические и морфологические данные подтверждают эффективность использования митомицина-С для создания модели недостаточности камбиальных клеток роговичного эпителия.

Воссозданная нами в эксперименте картина недостаточности камбиальных клеток роговичного эпителия подтверждает принятую в настоящее время теорию наличия региональных (монопотентных) стволовых клеток, являющихся источником регенерации роговичного эпителия и расположенных в области лимба.

Развивающаяся в результате различных патологических состояний недостаточность лимбальных клеток приводит к разрастанию на поверхности роговой оболочки клеток конъюнктивального эпителия, прорастанию сосудов и нарушению прозрачности.

Значительная воспалительная реакция, конъюнктивизация и формирование поверхностного помутнения роговицы у всех экспериментальных животных определяют необходимость создания специальных условий для полноценной регенерации при частичной потере лимбальных клеток роговичного эпителия и трансплантации региональных камбиальных клеток в случае полной или почти полной потери.

Удобство, простота и эффективность использования ММС для создания модели недостаточности камбиальных клеток роговичного эпителия позволяют предложить данную модель для использования в экспериментах по изучению эффективности новых лечебных воздействий при патологических состояниях роговичного эпителия.

Литература

- [1] Epithelial desquamation in the adult mouse cornea: A correlative TEM-SEM study / L.D.Hazlett [et al.] // Ophthalmic Res. – 1980. – V. 12. – P. 315.
- [2] He, Y. Limbal epithelial autograft transplantation for treatment of unilateral fibrous vascularized cornea caused by chemical burns / Y.He, B.Sun, X.Ding // Chung-Hua-Yen-Ko-Tsa-Chih. – 1996. – V. 32. – No. 1. – P. 11–14.
- [3] Pfister, R.R. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells / R.R.Pfister // CLAO-J. – 1994. – V. 20. – №1. – P. 64–72.
- [4] Репин, В.С. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина / В.С.Репин, А.А.Ржанинова, Д.А.Шаменков. – М.: "Реметэкс", 2002. – 165с.

- [5] Фриденштейн, А. Я. Клонирование стромальных клеток-предшественников / А.Я. Фриденштейн // Методы культивирования клеток. – Л.: Наука, 1987. – С. 257–265.
- [6] Беляев, В.С. Операции на роговой оболочке и склере / В.С.Беляев. – М.: Медицина, 1984. – 144 с.
- [7] Макаров, П.В. К хирургической тактике лечения тяжелой и особо тяжелой ожоговой травмы глаз (сообщение 2) /П.В.Макаров // Вестн. офтальмол. – 2002. – Т. 118. – №4. – С. 8–10.
- [8] Comparative study of intraoperative mitomycin C and -irradiation in pterygium surgery / S.Amano [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2000. – No. 84. – P. 618–621.

Поступила в редакцию 26/*VIII*/2006;
в окончательном варианте — 26/*VIII*/2006.

EXPERIMENTAL MODEL OF INSUFFICIENCY REGIONAL STEM CELLS CORNEAL EPITHELIAL

© 2006 E.S. Milyudin²

An experimental model of insufficiency regional stem cells of corneal epithelial without mechanical damage of a zone limb is developed. Experiments on two groups of animals are carried out. The animal of experimental group after removal epithelial of area limb carried out application of 0,04% MMC. Epithelization and inflammatory reaction faster end is marked in control group. In experimental group of animals on a surface of the cornea corneal caligo and growing of vessels are formed. Morphological development of conjunctival epithelium on a cornea surface is then confirmed.

Paper received 26/*VIII*/2006.
Paper accepted 26/*VIII*/2006.

²Milyudin Evgeniy Sergeevich (miljudin@mail.ru), Central Scientific Research Laboratory, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russia.