

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА EX VIVO РАЗМНОЖЕНИ ЛИМБАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ*

Христова Р, Здравков Я, Танев И

Медицински университет – София, УМБАЛ „Александровска“, Клиника по Очни болести

Transplantation of ex vivo expanded limbal stem cells*

Hristova R., Zdravkov Y., Tanev I.

Medical University – Sofia, University Hospital Alexandrovska, Department of Ophthalmology



Резюме

Цел: Цел на настоящото проучване е да се изследват възможностите на трансплантацията на ex vivo размножени автоложни лимбални епителни стволови клетки като метод за лечение на повърхостни очни заболявания.

Материали и методи: Трансплантации на автоложни ex vivo размножени стволови клетки бяха извършени на четирима пациенти на средна възраст 56.5 години преминали през Клиника по Очни болести към УМБАЛ „Александровска“. Всички те демонстрираха клинични белези на унилатерална лимбална стволочклетъчна инсуфициенция, асоциирана с трофични заболявания на очната повърхност, която бе демонстрирана чрез импресионна цитология. След получаване на информирано съгласие бе проведена минимално инвазивна лимбална биопсия. Получените материали бяха обработени по иновативен протокол за клетъчни култури без употреба на ксенобиотични продукти. Четиринадесет дни по-късно бе направено биологично покритие с готовия трансплантат. Проследяване на състоянието се извърши чрез оптична кохерентна томография на преден очен сегмент преди и след трансплантацията. Критериите за успех от трансплантацията на ex vivo размножени стволови клетки включват: 1. пълна епителизация на роговичната повърхност; 2. редукция на неоваскуларизацията или пълното ѝ изчезване; 3. възстановяване на нормални прозрачност, дебелина и рефлекс на роговицата; 4. подобрене на зрителната острота.

Резултати: При всички пациенти се наблюдава подобрене на клиничната картина и субективните оплаквания. При трима от изследваните бяха изпълнени четирите критерия за успешна трансплантация. При един от случаите не бе отчетено подобрене в зрителната острота, поради засягане на зрителния нерв от туморен процес. Не се наблюдаваха реакции на отхвърляне на трансплантата. Лимбалната биопсия не индуцира инсуфициенция на донорното око.

Изводи: Трансплантацията на ex vivo размножени автоложни лимбални стволови клетки е ефективен и безопасен метод за възстановяване на очната повърхност, който може да бъде приложен при различни заболявания, асоциирани с лимбална стволочклетъчна инсуфициенция.

Д-р Христова получи Първа награда за млад специалист в конкурса на името на проф. Ст. Дъбов на Конференцията "Новости в офталмологията" през 2016 г.

Адрес за кореспонденция:

ул. „Св. Георги Софийски“ № 1, София 1431

Автор за кореспонденция: Розалия Христова

ул. „Бурел“, бл. 72А, вх. Б, ап. 37, София 1408

For correspondence:

1 Georgi Sofiyski str., Sofia 1431

Corresponding author: Rozaliya Hristova

72A Burel str., app. 37, Sofiq 1408

Abstract

Purpose: To investigate the application of autologous ex vivo expanded limbal stem cell transplantation in the management of ocular surface disease.

Materials and methods: Autologous ex vivo expanded stem cells were transplanted to four patients with mean age 56.5 years from the Department of Ophthalmology, University Hospital Alexandrovska. All patients presented signs of unilateral limbal stem cell deficiency, associated with trophic disease of the ocular surface, which was demonstrated on impression cytology. After informed consent was obtained a minimally invasive limbal biopsy was performed. The limbal materials were cultured using a novel protocol without additional xenobiotic products. The grafts were transplanted after fourteen days. Anterior segment optical coherence tomography before and after the intervention was used for assessment of the condition. Success of the procedure was defined as 1. complete epithelialization of the corneal surface, 2. partial or complete reduction of neovascularization, 3. achieving normal corneal transparency, thickness and reflex, 4. visual acuity improvement.

Results: Clinical recovery was observed in all patients, as well as improvement of subjective ocular comfort. In three of the cases all four success criteria were met. Visual acuity of one patient did not change, due to neoplastic process, pervading the optic nerve. No graft rejection reactions were observed. Limbal biopsy did not induce limbal stem cell deficiency in the donor eye.

Conclusion: Transplantation of autologous ex vivo expanded limbal stem cells is an effective and safe method for ocular surface reconstruction, which can be applied in different conditions, associated with limbal stem cell deficiency.

Въведение

Първата очна структура, която взаимодейства с околната среда е епителният слой, покриващ конюнктивата и роговицата, заедно със слъзния филм. На границата между фенотипно различните роговичен и конюнктивен епител се открива особена транзиторна зона, наречена лимб. Лимбалната локализацията на епителните клетки, отговорни за регенеративните процеси в роговицата е доказана в редица проучвания [2,15].

Лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция (Limbal Stem Cell Deficiency - LSCD) се определя като частично или тотално засягане на лимба от травма или заболяване с намаление на броя стволови клетки под критичния праг, при който се нарушава равновесието

между загубата на клетки от повърхностните слоеве и клетъчната пролиферация. Процесът води до хронично възпаление, неоваскуларизация и конюнктивализация. Последиците са персистиращи болки и дискомфорт, помътняване на роговицата с намаление на зрението, което силно влошава качеството на живот на пациентите.

Дефицитът на лимбални стволови клетки участва в патофизиологичните механизми на голям брой заболявания, както и в неуспеха на редица оперативни интервенции, целящи възстановяване на очната повърхност. Лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция може да се наблюдава при химични изгаряния и травми, автоимунни болести, тежки инфекции и алергии на роговицата, усложнения след пре-

карана херпесна инфекция. Засягане на роговицата може да се наблюдава и при някои системни заболявания като захарен диабет, множествена склероза, след прекаран инсулт.

Симптомите на LSCD включват данни за хронично възпаление („червено око“), намалено зрение, епифора, фотофобия, блефароспазъм, повтарящи се епизоди на дразнене, болка, чувство за чуждо тяло. Клинично заболяването се представя с триадата хронично възпаление, неоваскуларизация и конюнктивализация на очната повърхност [12]. Биомикроскопски се наблюдават хиперемия на конюнктивата, неправилен роговичен рефлекс, вариабилна дебелина и прозрачност на роговицата, персистиращи или рекурентни епителни дефекти. Маркирането с флуоресцеин води до дифузно или точковидно багрене и демаркационна линия между зони на нормален и абнормен роговичен епител. В зоната на лимба се наблюдава заличен контур на палисадите на Vogt, вазодилатация и периферна роговична неоваскуларизация. При по-напреднали случаи може да се формира панус, стромална скарификация, изтъняване и перфорация на роговицата [8].

Лечението включва консервативни и оперативни терапевтични подходи. Локално се прилагат изкуствени съзли, имуномодулатори, матрикс регенеративна терапия, нервен растежен фактор [1,6,10]. При липса на ефект от консервативно лечение и засягане на зрителната ос се преминава към оперативно възстановяване на очната повърхност. Х. Дуа и сътр. съобщават положителни резултати от sequential sectoral conjunctival epitheliectomy в комбинация с амниотична мембрана [5]. Други методи включват авто- и ало-кератолимбална трансплантация [7,8]. Основни недостатъци на тези процедури са рискът от индуциране на инсуфициенция на донорното око и необходимост от продължителна иму-

носупресивна терапия при алогенните трансплантации [19].

Това е причина да се разработят продукти от собствени тъкани на пациента, базирани на тъканното инженерство. Пелегрини и сътр. през 1997г. за първи път съобщават резултати от трансплантация на ex vivo размножени лимбални стволови клетки [11]. До момента методиката претърпява редица модификации, като основната насока е създаване на биологично безопасна технология без употреба на ксенобиотични продукти.

Материали и методи

Настоящото проучване бе одобрено от Етичната Комисия на Медицински Университет-София (КЕНИМУС) и проведено в съответствие с Декларацията от Хелзинки.

Методът бе приложен при 4 пациенти на средна възраст 56.5 годни (от 40 до 74г.) от Клиника по Очни болести към УМБАЛ Александровска с клинични белези на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Проведени бяха рутинни изследвания – определяне на зрителна острота, биомикроскопия, офталмоскопия, тонометрия.

Критериите за поставяне на клинична диагноза включват триадата хронично възпаление, неоваскуларизация и конюнктивализация на роговичната повърхност. Етиологията на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция при пациентите е показана на Таблица II.

Получени бяха проби за импресионна цитология, маркирани с хематоксилин и еозин, Periodic acid Schiff (PAS) и Папаниколау по методика, сходна със съобщената от Ценг [18].

Проведе се оптична кохерентна томография на преден очен сегмент (Topcon 3DOCT-2000FA, 3D Anterior seg., Radial Anterior seg., Line Anterior seg.) на лезиите в засегнатите очи и на зоните предвидени за лимбална би-

опсия.

Поради липса на ефект от консервативно лечение се взе решение за оперативно възстановяване на очната повърхност.

Лимбална биопсия

След получаване на информирано съгласие се проведе минимално инвазивна лимбална биопсия. Процедурата включва внимателна дисекция на лимбален епител с размер 2x2мм в зона с демонстративни палисади на Vogt на 12ч. при стриктно спазване на асептични условия. Полученият материал бе транспортиран до тъканна банка „Биорегенерация” в среда Stem α 2 (STEM ALPHA, Rhône-Alpes, France).

Клетъчни култури

За ex vivo размножаване на клетките бе използван иновативен протокол без ксенобиотични продукти, посочен от производителя (CnT-Frame, CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland). За преносител бе използвана прясна нативна амниотична мембрана с размер 4x4см. Тя бе поставена в специална фиксираща система с базална мембрана нагоре. Системата бе инкубирана на 37° с 5% CO₂ и 95% въздух. Растежът се проследи чрез фазовоконтрастна микроскопия и хранителната среда се сменяше през ден. Клетъчните култури не съдържаха хранещи клетъчни слоеве (напр. миши 3T3 фибробласти) и не бе добавен телешки серум.

Техника на трансплантация

С готовите трансплантати бе направено биологично покритие на роговицата при всеки пациент, което бе фиксирано с шев 10/0. Амниотичната мембрана бе поставена с епителната страна нагоре. След това се адаптира втори протективен слой (amniotic membrane patching), който инхибира протеиназната ак-

тивност и осигурява антиинфламаторен и антиангиогенен ефект [3,9,17]. По този начин се забавя разграждането на амнионът, преносител на стволовите клетки и се подпомага интегрирането им към тъканите на реципиента.

Оптична кохерентна томография на преден очен сегмент (AS-OCT) бе проведена и след операцията.

Резултати

При всички пациенти се наблюдаваха клинични данни за унилатерална лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция - хиперемия на конюнктивата, неправилен роговичен рефлекс, вариабилна дебелина и прозрачност на роговицата, персистиращи епителни дефекти, дифузно или точковидно багрене с флуоресцеин, заличен контур на палисадите на Vogt, роговична неоваскуларизация (Фигура 1). Поради трофичния характер на основното заболяване при всички пациенти бе установена намалена до липсваща роговична сетивност.

Конюнктивализацията на очната повърхност бе доказана чрез импресионна цитология, която демонстрира PAS позитивни клетки по роговичната повърхност, белези на кератинизация, маркирана по Папаниколау и възпалителна инфилтрация. (Фигура 2).

Чрез AS-OCT се наблюдаваха дефекти и изтъняване на епителния слой, стромална хиперрефлексивност, неравномерна роговична дебелина. При по-тежките случаи се наблюдава стромално изтъняване със или без перфорация (Фигура 3). В зоните предвидени за получаване на лимбален материал не се установиха патологични изменения (Фигура 4).

Проведената минимално инвазивна биопсия в сектор с демонстративни палисади на Vogt на 12ч. не индуцира лимбална инсуфициенция на донорното око и епителизира напълно в рамките на 7 дни (Фигура 4).

От получените материали между 10 и 14

ден се формираха епителни слоеве от клетки с морфологични белези на LESC's – малки, кубовидни, с голямо ядро и висок митотичен потенциал (Фигура 5). Оценката бе извършена чрез фазовоконтрастна микроскопия.

Критериите за успех от трансплантацията на лимбални стволови клетки се дефинират като пълна епителизация на роговичната повърхност, редуция на неоваскуларизацията или пълното ѝ изчезване, възстановяване на нормални прозрачност, дебелина и рефлекс на роговицата [11, 14]. При интактен заден очен сегмент се включва и подобрението на зрителната острота. При трима пациенти всички критерии за успех бяха изпълнени (Фигура 6).

При един от случаите зрителната острота не се промени след трансплантацията, поради засягане на зрителния нерв от туморен процес. Наблюдава се подобрение и на субективните оплаквания при всички пациенти.

Проведената AS-OCT след трансплантацията демонстрира добре адаптирано биологично покритие на първи постоперативен ден. Четири седмици след оперативната интервенция роговичната повърхност бе напълно епителизирана с възстановена дебелина на повърхностните слоеве при всички от изследваните случаи (Фигура 7).

Дискусия

Лечението на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция, асоциирана с различни повърхностни очни заболявания може да бъде чрез топикални средства или редица оперативни интервенции. Консервативното лечение включва различни медикаменти, целящи адекватно овлажняване на очната повърхност, подобряване на трофиката и имуномодулиращ ефект. Прилага се при частична инсуфициенция, когато зрителната ос не е засегната.

При представените пациенти не бе наблюдавано подобрение от топикалната терапия и

поради засягане на зрителната ос се пристъпи към оперативно възстановяване на очната повърхност в съответствие с актуалните терапевтични алгоритми [4].

Съвременното лечение на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция е трансплантацията на *ex vivo* размножени автоложни стволови клетки. В научните съобщения до момента етиологията на лимбалната инсуфициенция при трансплантираните пациенти е свързана с химични/термични изгаряния, цикатризиращ пемфигоид или синдром на Stevens-Johnson [13]. В настоящото проучване са включени пациенти, при които инсуфициенцията е асоциирана с трофични процеси – невротрофичен кератит или очна форма на розацея, поради което се установи и силно намалена до липсваща роговична сетивност.

Предимствата на трансплантацията на *ex vivo* размножени стволови клетки са ниският риск от индуциране на инсуфициенция в донорното око, поради минимално инвазивния характер на биопсията и автоложният произход на използваните клетки, което не налага имуносупресивна терапия. При представените пациенти се наблюдава пълна епителизация на донорното око в рамките на 7 дни без възникване на усложнения.

Трансплантацията на *ex vivo* размножени стволови клетки все още е обект на проучвания и до момента има съобщени редица протоколи [16]. Основна насока в развитието ѝ е създаване на биологично безопасна технология без добавяне на ксенобиотични продукти. Тя трябва да осигурява максимална клонална експанзия и едновременно да съхрани недиференциран фенотип и пролиферативен потенциал на стволовите клетки.

В настоящото проучване бе използван протокол, отговарящ на всички съвременни изисквания и стандарти. Наблюдава се ефективна клонална експанзия и формиране на епителни

слоеве при всички пациенти. Сходни резултати са предствени и от други чуждестранни автори, използващи протоколи без добавяне на ксенобиотични продукти [14].

След трансплантацията на амниотичната мембрана, преносител на *ex vivo* размножените стволови клетки, не се наблюдаваха реакции на отхърляне, съобщени в докладите на редица автори [14, 20]. Клиничните белези на състоянието се дефинират като прогресивна конюнктивализация на роговичната повърхност и наличие на рецидивиращи епителни дефекти. Успех от процедурата при предста-

вените пациенти бе отчетен както по отношение на обективните признаци, така и по субективното подобрене в качеството на живот на пациентите.

Заклучение

В настоящото проучване представяме трансплантацията на *ex vivo* размножени стволови клетки като ефективен и безопасен метод за възстановяване на очната повърхност при заболявания, асоциирани с лимбална стволочклетъчна инсуфициенция.

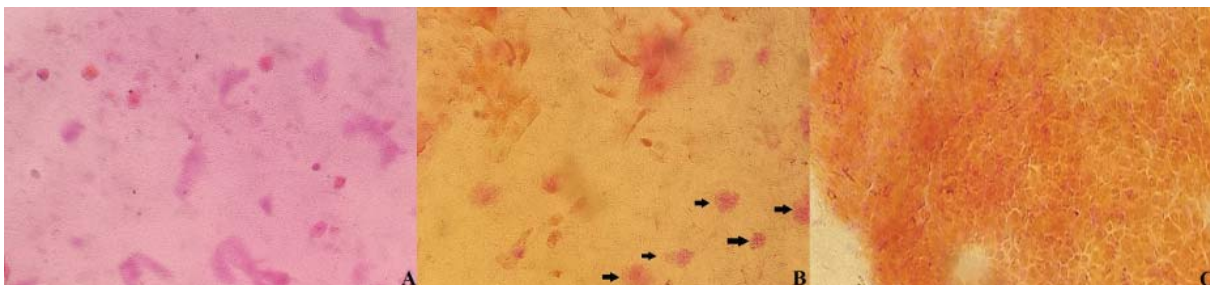
Таблица I. Данни за възрастта на пациентите, заболяванията, асоциирани с лимбална стволочклетъчна инсуфициенция, зрителната острота преди и след интервенцията.

	Пол	Възраст	Етиология	Зрителна острота преди трансплантацията	Зрителна острота след трансплантацията
1	М	71	Невротрофичен кератит	0.02	0.2
2	М	74	Очна розацея, след ПК	PPLC	0.01
3	Ж	41	Невротрофичен кератит, вероятно след прекаран херпетичен кератит	PPLC	0.03
4	Ж	40	Невротрофичен кератит, след лъчетерапия на карцином в областта на максиларния синус	PLC	PLC

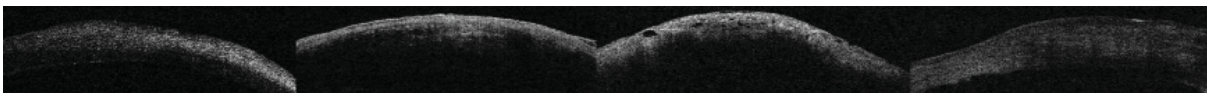
Фигура 1. Клинична картина при представянето. Наблюдават се белези на LSCD – конюнктивна хиперемия, неравномерен епител, периферна неоваскуларизация и конюнктивализация на очната повърхност.



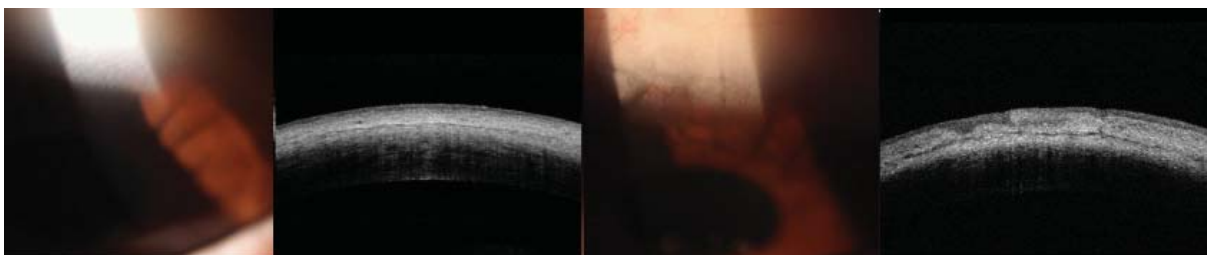
Фигура 2. Имресивна цитология на очната повърхност. Белег на конюнктивализация е наличието на PAS позитивни клетки по роговичната повърхност (A). Наблюдаваха се възпалителни клетки (B) и кератинизация на епитела (C).



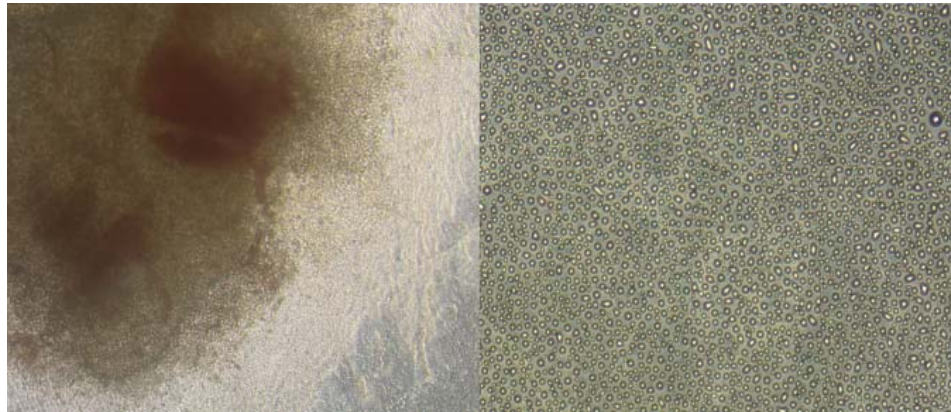
Фигура 3. Предоперативна оценка на състоянието чрез AS-OCT.



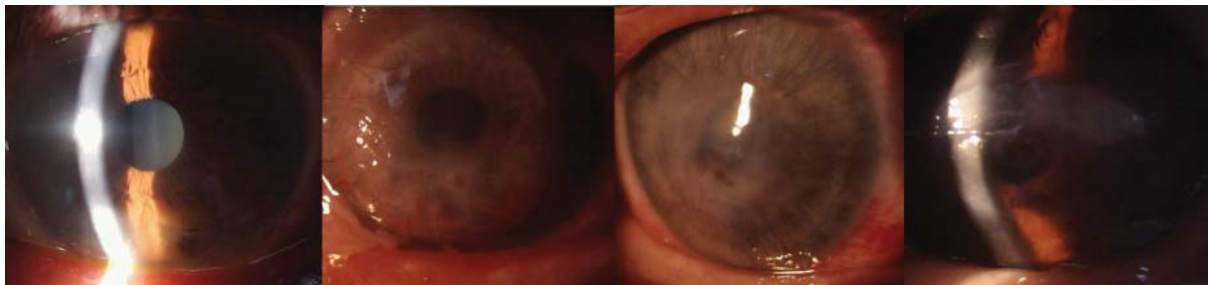
Фигура 4. Зона с демонстративни палисади на Vogt на 12ч., предишна за минимално инвазивна лимбална биопсия. А. Биомикроскопия на сегмента. В. AS-OCT в зоната не установи патологични промени. С. Биомикроскопски същия сегмент бе нашъ;но епителизирал седем дни след проведената биопсия, което се потвърди и на AS-OCT (D).



Фигура 5. Фазовоконтрастна микроскопия на клетъчните култури: А. Общ изглед на материала, разположен върху амниотичната мембрана. В. По-големи увеличения показват морфологията на клетките – малки, кубовидни, с голямо ядро и чести митози.



Фигура 6. Биомикроскопия четиринадесет дни след трансплантацията на автоложни ex vivo размножени лимбални стволови клетки.



Фигура 7. Постоперативния статус бе проследен с AS-OCT – възстановена роговична дебелина, напълно епителизирана повърхност.



Книгопис

1. Del Buey MA, Casas P, Caramello CM, et al. Analysis of the efficacy of the tissue regenerating agent (RGTA) 0.01% polycarboxymethylglucose sulfate in the treatment of neurotrophic corneal ulcers and persistent

epithelial defects. *Acta Ophthalmologica*, 2015, 93, S255.

2. Dua H. S., Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology*. 2000;44(5):415–425.

3. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology.

Surv Ophthalmol. 2004;49(1):51–77.

4. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J. Ophthalmol.* 2000, 48, 83–92.

5. Dua HS. Sequential sectoral conjunctival epitheliectomy. In: *Ocular surface disease medical and surgical management*, eds. Holland EJ, Mannis MJ, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer, 2002, 168–174.

6. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, et al. Corneal wound healing promoted by 3 bloodderivatives: an in vitro and in vivo comparative study. *Cornea.* 2014, 33, 614–620.

7. Ilari L, Daya SM. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology.* 2002, 109, 1278–1284.

8. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology.* 1989, 96, 709–722.

9. Kim JS, Kim JC, Na BK, et al. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits protease activity on wound healing following acute corneal alkali burns. *Exp Eye Res.* 2000;70(3):329–337.

10. Lambiase S, Manni L, Bonini S, et al. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000, 41, 1063–1069.

11. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet.* 1997, 349, 990–993.

12. Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology.* 1995, 102, 1476–1485.

13. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med.* 2010;363(2):147–155.

14. Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK, et al. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(11):1525–1529.

15. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64 K corneal keratin in vivo and in culture. *J Cell Biol.* 1986;103:49–62.

16. Tseng SCG, Chen SY, Shen YC, et al. Critical appraisal of ex vivo expansion of human limbal epithelial stem cells. *Current Molecular Medicine.* 2010, 10, 841–850.

17. Tseng SCG, Espana EM, Kawakita T, et al. How does amniotic membrane work? *Ocul Surf.* 2004;2(3):177–187.

18. Tseng SCG. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985;92:728–33.

19. Tsubota K, Toda I, Saito H, et al. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology.* 1996, 102, 1486–1496.

20. Vazirani J, Basu S, Kenia H et al., “Unilateral partial limbal stem cell deficiency: contralateral versus ipsilateral autologous cultivated limbal epithelial transplantation,” *American Journal of Ophthalmology*, vol. 157, no. 3, pp. 584.e2–590.e2, 2014.