

Лимбальная недостаточность: этиология, патогенез, принципы и перспективы хирургического лечения

А.С. Дубовиков — клинический ординатор

И.О. Гаврилюк — врач-офтальмолог

А.Н. Куликов — д-р мед. наук, начальник кафедры офтальмологии

С.В. Чурашов — д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры

В.Ф. Черныш — канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры

А.В. Безушко — врач-офтальмолог

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны
Российской Федерации, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Обзор посвящен современному представлению об этиологии и патогенезе лимбальной недостаточности, рассмотрена история развития тканевой и клеточной трансплантации лимбальных эпителиальных стволовых клеток, а также обсуждены некоторые перспективные направления лечения пациентов с лимбальной недостаточностью.

Ключевые слова: роговица, лимбальная недостаточность, лимбальные эпителиальные стволовые клетки, эпителий слизистой оболочки полости рта, тканевая трансплантация, клеточная трансплантация, тканевая инженерия.

Для цитирования: Дубовиков А.С., Гаврилюк И.О., Куликов А.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф., Безушко А.В. Лимбальная недостаточность: этиология, патогенез, принципы и перспективы хирургического лечения. Российский офтальмологический журнал. 2019; 12 (1):103-111. doi: 10.21516/2072-0076-2019-12-1-103-111

По данным ВОЗ, в 2010 г. во всем мире зарегистрировано 2,46 млн случаев понижения остроты зрения и 1,56 млн случаев слепоты пациентов по причине помутнений роговицы различной интенсивности [1]. Зрительная реабилитация таких пациентов в основном связана с оптической кератопластикой. Однако функциональные исходы этой операции не всегда благоприятны, особенно у лиц с сосудистыми помутнениями роговицы. Одной из главных причин формирования таких помутнений является гибель стволовых клеток роговичного эпителия вследствие различных патологических состояний глазной поверхности и связанная с ней несостоятельность роговичной регенерации [2]. Разработка методов восстановления роговичной регенерации у таких пациентов является важной задачей офтальмохирургии.

Этиопатогенез лимбальной недостаточности.
Популяция стволовых клеток эпителия рогович-

ного фенотипа расположена в складках палисада Vogt роговичной части лимба [3]. Она обеспечивает в течение всей жизни постоянное восполнение эпителиального покрова роговицы в норме и при ее заболеваниях и травмах, а также играет роль барьера для конъюнктивального эпителия.

Повреждение или полная гибель популяции лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК), а также нарушение интенсивности их пролиферации вызывают состояние, получившее название Limbal Stem Cell Deficiency (LSCD) [4] — «лимбальная недостаточность (ЛН)» [5].

Клинически ЛН характеризуется возникновением персистирующих и рецидивирующих эпителиальных дефектов роговицы, хроническим воспалением глазной поверхности, ведущим к деградации базальной мембраны эпителиоцитов. В условиях недостаточности или отсутствия источника

регенерации роговичного эпителия на роговицу начинает медленно нарастать эпителий конъюнктивы (конъюнктивализация роговицы), что сопровождается вращением в строму новообразованных сосудов с формированием фиброваскулярного pannusa (образованием сосудистого бельма) [6, 7]. Все это приводит к значительному понижению остроты зрения пораженных глаз. В случае гибели всей популяции ЛЭСК развивается полная (тотальная) ЛН; при частичной потере ЛЭСК — частичная ЛН, а патологические изменения в роговице развиваются преимущественно в секторе пораженного лимба.

К этиологическим факторам, вызывающим развитие ЛН, относят ожоги глаз, синдром Стивенса — Джонсона, воспалительные заболевания глазной поверхности, воздействие ультрафиолетовых лучей, тяжелое течение синдрома «сухого глаза», многократные кровоизлияния, повышенная хирургическая активность в зоне лимба и др. [8–10].

По патогенезу принято различать 2 категории ЛН [5]. Первая характеризуется первичным повреждением непосредственно стволовых клеток (СК), при которой окружающие их структуры лимба не страдают. Для второй характерно первичное повреждение морфологического микроокружения ЛЭСК в лимбе, приводящее к разрушению клеточного каркаса, экстрацеллюлярного матрикса и перикорнеальных кровеносных сосудов, а также к денервации лимбальной зоны. Оно вызывается медленно прогрессирующим хроническим воспалением тканей глазной поверхности, что приводит к нейротрофическим изменениям и в конечном итоге заканчивается истощением пролиферации ЛЭСК, вплоть до ее прекращения [5]. В условиях тотальной ЛН восстановление прозрачности роговицы посредством традиционной кератопластики исключено ввиду неизбежности рецидива

фиброваскулярного pannusa и помутнения роговичного трансплантата [11].

Решение данной проблемы возможно за счет привнесения на роговицу СК роговичного фенотипа. В такой реконструктивной хирургии существует два подхода. Первый основан на пересадке лимбальных тканей, содержащих ЛЭСК (лимбальной трансплантации, ЛТ), а второй — на трансплантации культивированных ЛЭСК роговицы. Это, в свою очередь, предусматривает разделение всех трансплантаций для реконструкции глазной поверхности на аллогенные и аутологичные. При аутологичной лимбальной трансплантации ткань берется из парного неповрежденного глаза пациента, в то время как при аллогенной забор осуществляется у живого донора или кадаверного источника.

Классификацию таких оперативных вмешательств в 1996 г. предложили E. Holland и G. Schwarz [12]. Позднее, в 2011 г., она была модернизирована S. Daya и соавт., в результате чего в настоящее время ее окончательный вариант существует под названием «Cornea Society Nomenclature for Ocular Surface Rehabilitative Procedures» [13]. В этой классификации отражены также методики восстановления стабильной эпителизации роговицы посредством трансплантации тканей (Other Mucosal Transplantation) и культивированных эпителиальных стволовых клеток (Other Ex Vivo Cultivated Mucosal Transplantation) из альтернативных источников, таких как слизистая оболочка ротовой полости. Таким образом, в арсенале современной офтальмологии имеется две основные методики хирургической реэпителизации роговицы: первая основана на пересадке тканей (Tissue Transplantation) (табл. 1), а вторая — на трансплантации культивированных эпителиоцитов (Ex Vivo Tissue Engineered) (табл. 2).

Таблица 1. Трансплантация тканей для реэпителизации роговицы
Table 1. Tissue transplantation for corneal reepithelialization

Методика трансплантации Transplantation technique	Аббревиатура Abbreviation	Донор Donor	Ткань для трансплантации Tissue for transplantation
Лимбальная трансплантация Limb Transplantation			
Conjunctival limbal autograft	CLAU	Парный глаз пациента Fellow patient eye	Лимб и конъюнктура Limb and conjunctiva
Cadaveric conjunctival limbal allograft	c-CLAL	Кадаверный глаз Cadaveric eye	Лимб и конъюнктура Limb and conjunctiva
Living related conjunctival limbal allograft	lr-CLAL	Глаз живого родственника Eye of living relative	Лимб и конъюнктура Limb and conjunctiva
Living nonrelated conjunctival limbal allograft	lnr-CLAL	Глаз живого донора (не родственника) Eye of living donor (not relative)	Лимб и конъюнктура Limb and conjunctiva
Keratolimbal autograft	KLAU	Парный глаз пациента Fellow patient eye	Лимб и роговица Limb and cornea
Keratolimbal allograft	KLAL	Кадаверный глаз Cadaveric eye	Лимб и роговица Limb and cornea
Другие ткани (слизистая оболочка) Other mucosal transplantation			
Oral mucosa autograft	OMAU	Пациент Patient	Слизистая полости рта Oral cavity mucosal tissue

Таблица 2. Ex Vivo Tissue Engineered для реэпителизации роговицы
Table 2. Ex Vivo Tissue Engineered for corneal reepithelialization

Методика трансплантации Transplantation technique	Аббревиатура Abbreviation	Донор Donor	Ткань для трансплантации Tissue for transplantation
Ex Vivo Limbal Transplantation (CLET)			
Ex vivo cultivated limbal autograft	EVLAU	Парный глаз пациента Fellow patient eye	Лимб и роговица Limb and cornea
Ex vivo cultivated cadaveric limbal allograft	EVc-LAL	Кадаверный глаз Cadaveric eye	Лимб и роговица Limb and cornea
Ex vivo cultivated living-related limbal allograft	EVlr-LAL	Глаз живого родственника Eye of living relative	Лимб и роговица Limb and cornea
Ex vivo cultivated living nonrelated limbal allograft	EVlnr-LAL	Глаз живого донора (не родственника) Eye of living donor (not relative)	Лимб и роговица Limb and cornea
Other Ex Vivo Cultivated Mucosal Transplantation			
Ex vivo cultivated oral mucosa autograft (COMET)	EVOMAU	Пациент Patient	Слизистая полости рта Oral cavity mucosal tissue

Тканевая трансплантация — Tissue Transplantation — в лечении дисфункции ЛЭСК. Автором одной из ранних работ, посвященных поиску оптимальной хирургической методики реконструкции роговицы, является R. Thoft. В 1984 г. он описал методику аллогенной кератоэпителиопластики (keratoepithelioplasty procedure), которая осуществлялась путем трансплантации эпителиального роговичного лоскута, взятого с периферических областей кадаверной роговицы (cadaveric corneal allograft) [14]. Она оказалась эффективной при лечении периферических язв роговицы, обеспечивая ее ткань эпителиоцитами роговичного фенотипа, что способствовало предотвращению конъюнктивализации роговицы.

В 1989 г. K. Kenyon и S. Tseng [15] впервые осуществили успешную аутологичную ЛТ (limbal autograft transplantation) в клинике. Ввиду аутологичности метода отсутствовала проблема отторжения трансплантата. Поэтому операция получила широкое признание и в настоящее время остается методом выбора при лечении односторонней ЛН. Однако в случаях даже незначительного повреждения лимба парного глаза забор лимбально-конъюнктивальных трансплантатов как носителей СК связан с риском развития на глазу донора ятрогенной ЛН, а при двустороннем поражении он просто невозможен. Поэтому для лечения двусторонней дисфункции СК позднее начали предлагать различные варианты аллогенной трансплантации.

Так, в 1994 г. R. Tsai и S. Tseng предложили метод аллогенной керато-лимбальной трансплантации (keratolimbal allograft (KLAL) procedure) [16], при которой в качестве источника СК используются кадаверные глаза (рис. 1). Позднее E. Holland в 1996 г. (рис. 2) сообщил об успешном применении в лечении двусторонней ЛН лимбально-конъюнктивального аллотрансплантата живого родственника (living related conjunctival limbal allograft, lr-CLAL)

[17]. Эта методика также является аллогенной трансплантацией и требует системной иммуносупрессии. При этом выполнение этой процедуры невозможно при отсутствии у пациента близких родственников, способных стать донорами тканей.

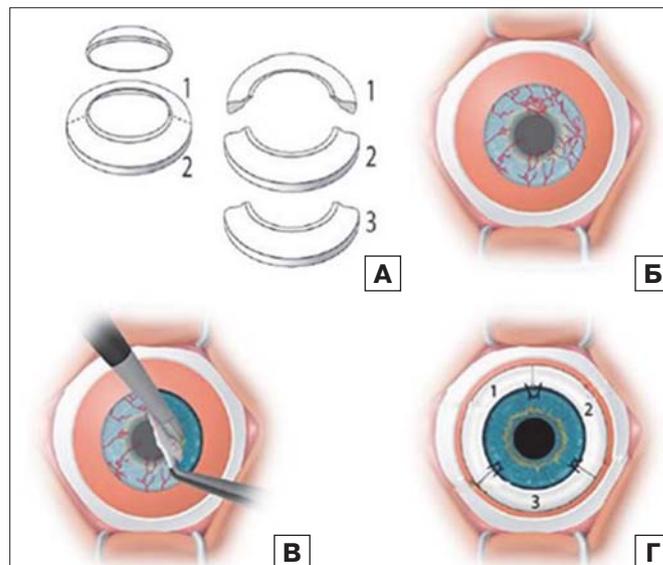


Рис. 1. Этапы выполнения аллогенной кератолимбальной трансплантации (KLAL). А — KLAL-трансплантаты (1, 2, 3), содержащие лимбальную зону, сформированные из донорских корнеосклеральных лоскутов шириной 7,5 мм. Б — круговая перитомия и разведение конъюнктивы в стороны на глазу реципиента. В — выполнение поверхностной кератэктомии (удаление паннуса) на глазу реципиента. Г — KLAL-трансплантаты (1, 2, 3), фиксированные вокруг лимба реципиента при помощи нейлона 10/0 [4].
Fig. 1. Schematic of major steps to KLAL surgery. А — Donor KLAL lenticules are fashioned from 2 corneoscleral rims from deceased donors with the central 7.5 mm of the cornea removed by trephination. Б — Conjunctival peritomy for 360 degrees and tenectomy is performed and the conjunctiva retracts. В — Abnormal corneal epithelium and fibrovascular pannus are removed by superficial dissection using blunt and sharp techniques such as with a 64 Beaver blade. Г — KLAL lenticules are secured to the recipient limbus using 10-0 nylon sutures and tissue glue.

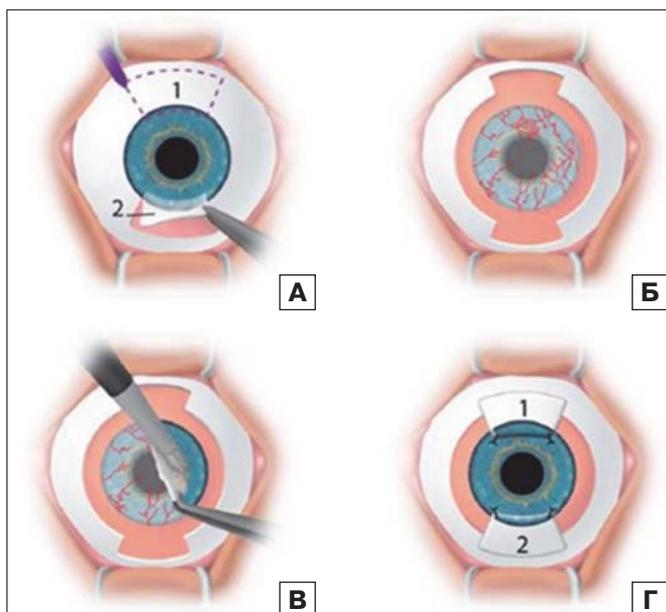


Рис. 2. Этапы выполнения аутологичной трансплантации лимбально-конъюнктивального лоскута (CLAU); лимбально-конъюнктивальной аллотрансплантации (lr-CLAL) и с-CLAL. А — разметка и забор 2 лимбально-конъюнктивальных лоскутов (1, 2) от донорского глаза в меридиане 6 и 12 ч. Б — круговая перитомия и выкраивание конъюнктивы под размер донорских лоскутов на глазу реципиента. В — выполнение поверхностной кератэктомии (удаление паннуса) на глазу реципиента. Г — донорские трансплантаты (1, 2), фиксированные возле лимба реципиента при помощи нейлона 10/0 [4].

Fig. 2. Schematic of the CLAU/CLAL procedure. А — Marking and harvesting of the conjunctival and limbal grafts of the donor tissue at the 12-o'clock and 6-o'clock positions. Б — Preparation of the CLAU recipient site with a 360-degree peritomy and resection of the conjunctiva at the 12-o'clock and 6-o'clock positions for placement of the donor tissue. В — Superficial keratectomy of the recipient cornea. Г — Placement of the CLAU or LR-CLAL grafts.

Одну из модификаций тканевых пересадок в 2011 г. предложили J. Viber и соавт. [18]. Они разработали операцию, сочетающую в себе KLAL и lr-CLAL. Этот метод получил название Cincinnati Procedure (рис. 3). Он оказался особенно актуальным в лечении глаз с тяжелыми поражениями не только лимба, но и конъюнктивального покрытия.

К настоящему времени предложено множество модификаций методики тканевых трансплантаций для лечения ЛН. Однако все они не лишены недостатков. Так, ауто трансплантация несет в себе риск развития на здоровом глазу-доноре ятрогенной ЛН, а при двустороннем поражении ее выполнение вовсе невозможно. Аллотрансплантация связана с проблемой гистосовместимости тканей донора и реципиента, которая в определенной степени решается только при помощи системной иммуносупрессии [4]. При этом она не исключает рецидивов конъюнктивализации роговицы ввиду не только высокой частоты отторжений трансплантата, но и вследствие постепенной потери донорских клеток с течением времени. В литературе имеются данные о том, что в 50 % случаев всех аллогенных пересадок в течение

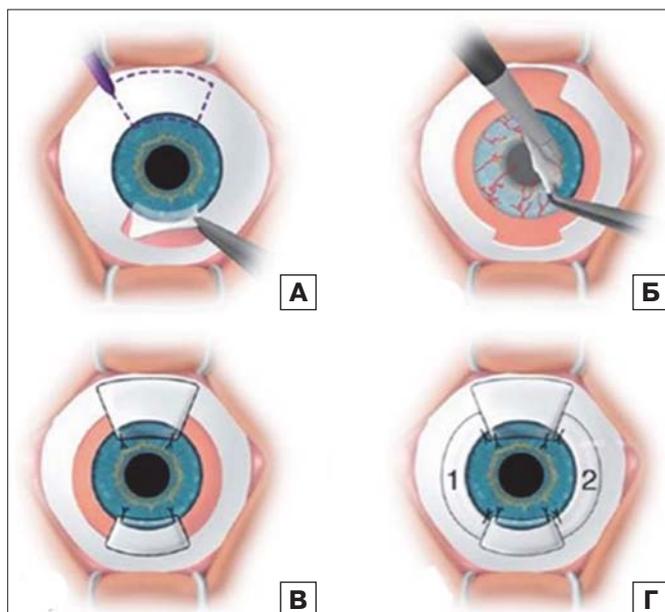


Рис. 3. Этапы выполнения Cincinnati Procedure. А — разметка и забор 2 лимбально-конъюнктивальных лоскута lr-CLAL от донорского глаза в меридиане 6 и 12 ч. Б — на глазу реципиента выполнена круговая перитомия и выкраивание конъюнктивы под размер донорских lr-CLAL-лоскутов. Выполняется поверхностная кератэктомия (удаление паннуса). В — донорские lr-CLAL-трансплантаты, фиксированные в меридиане 6 и 12 ч возле лимба реципиента при помощи нейлона 10/0. Г — KLAL-трансплантаты (1, 2), фиксированные к оставшимся частям лимба реципиента при помощи нейлона 10/0 [4].

Fig. 3. Schematic of the Cincinnati Procedure. А — Marking and harvesting of the lr-CLAL grafts of the donor tissue at the 12-o'clock and 6-o'clock positions. Б — Superficial keratectomy of the recipient cornea. Preparation of the lr-CLAL recipient site with a 360-degree peritomy and resection of the conjunctiva at the 12-o'clock and 6-o'clock. В — Placement of the lr-CLAL grafts. Г — Placement of the KLAL grafts.

3 лет трансплантат перестает выполнять свои функции [19], а 62 % всех неблагоприятных исходов пересадок связано с отторжением трансплантата [4].

Трансплантации культивированных эпителиоцитов (Ex Vivo Tissue Engineered) в лечении лимбальной недостаточности. Ввиду недостатков описанных выше тканевых методов реэпителизации роговицы многие группы исследователей сосредоточились на разработке новых способов лечения патологий, связанных с ЛН. Главным их принципом стало культивирование ЛЭСК на различных субстратах-носителях с последующей трансплантацией полученного монослоя клеток на роговицу поврежденного глаза. Такой подход обеспечивает забор минимального количества клеточного материала без нанесения сколько-нибудь значимого повреждения лимбальной зоне глаза-донора. Успех данного способа реэпителизации роговицы связан с использованием эффективных факторов роста и оптимального субстрата для культивирования СК, а также с наличием подходящего источника клеточного материала [3].

Факторы роста. История культивирования эпителиальных клеток начинается с 1975 г. Именно

тогда J. Rheinwald [20] и H. Green [21] сообщили о выполнении процедуры культивирования эпидермальных пластов и сосредоточили внимание на выращивании роговичных эпителиоцитов. Позднее, в 1979 г., H. Green [21] экспериментально доказал, что при культивировании СК необходимыми условиями для длительного поддержания пролиферации различных типов эпителиоцитов является наличие фибробластов, а также достаточное количество факторов роста и цитокинов. Такая, содержащая фидерные (питающие) фибробласты, культуральная система получила название «3Т3-система». Аббревиатура 3Т3 отражает наличие в культуре стандартной 3Т3-линии фибробластов мышинных эмбрионов, впервые полученной G. Todaro и H. Green [22] еще в 1963 г. путем их пересевания каждые 3 дня в концентрации 3×10^5 (3 дня культивирования — Transfer — в концентрации 3×10^5 клеток). После 20–30 поколений достигалась спонтанная бессмертность и стабильная скорость роста 3Т3-клеток, выделяющих необходимые факторы роста [23]. 3Т3-система для культивирования эпителиоцитов роговицы, конъюнктивы и кожи была использована в эксперименте на кроликах еще в 1977 г. [24]. Однако для выращивания эпителия роговицы человека впервые ее применили только в 1997 г. [25].

С тех пор мышинные 3Т3 фидерные клетки стали широко применяться для культивирования ЛЭСК. Однако наличие в культуральной среде материала животного происхождения связано с риском передачи зоонозной инфекции реципиенту. Поэтому в настоящее время используются человеческие фидерные клетки: жировой ткани [26], мезенхимальные стволовые [27], дермальные фибробласты [28] и т. д.

Помимо использования фидерных клеток в культуральных системах, для поддержания пролиферации и дифференцировки СК в настоящее время применяются различные ксенобиотические составляющие, к которым, в частности, относится эмбриональная бычья сыворотка (FBS). Однако ввиду опасности передачи реципиенту возбудителей различных инфекций от ее использования стали постепенно отказываться. На сегодняшний день предложена аутологичная сыворотка (AS), использование которой значительно безопаснее и не уступает по эффективности FBS [29].

Перспективными исследованиями в области тканевой инженерии являются также работы, направленные на создание фидерсвободных и бессывороточных культуральных систем. К ним относится использование для культивирования СК в системах, содержащих эпидермальный фактор роста и новую добавку B-27 к среде D-MEM [3], а также ингибитор Rho-киназы (ROCK) и фактор роста кератиноцитов [30].

Субстрат для культивирования. Хороший субстрат должен обладать высокой биосовместимостью, не иметь иммуногенных свойств, не вызывать воспаления, а также поддерживать прозрачность и

стабильность культивируемого эпителиального пласта, способствовать пролиферации и адгезии клеток [3].

Впервые решение данной проблемы предложил J. Friend, который в 1982 г. сообщил об успешном опыте культивирования роговичных эпителиоцитов на обнаженной строме роговицы кроликов [31]. G. Pellegrini и соавт. [25] в 1997 г., используя в качестве субстрата для культивирования вазелиновую марлю и мягкую контактную линзу, сообщили о первом успешном клиническом опыте трансплантации культивируемого монослоя ЛЭСК при лечении односторонней ЛН. В 2000 г. R. Tsai и соавт. [32] успешно выполнили аутогенную трансплантацию ЛЭСК, культивированных на нативной амниотической мембране (AM). В том же году N. Koizumi и соавт. [33] доказали, что при культивировании на деэпителизированной AM ЛЭСК быстрее формируют многослойный пласт, а базальные эпителиоциты адгезируются к мембране амниона, за счет чего монослой приобретает повышенную прочность. В 2001 г. N. Koizumi и соавт. [34] успешно культивировали аллогенную ткань лимбальной зоны на деэпителизированной AM с одновременной поддержкой 3Т3-фибробластов и добились стабильной эпителизации роговиц у больных с синдромом Стивенса — Джонсона в течение 6 мес.

В настоящее время AM считается золотым стандартом среди предложенного множества биологических и синтетических каркасов для культивирования [3]. Она способна ингибировать патологическое субэпителиальное рубцевание, обладает противовоспалительными свойствами, содержит различные факторы роста и цитокины, индуцирующие эпителизацию и заживление ран, а также напоминает базальную мембрану роговичного эпителия и способна интегрироваться в роговичную строму [5, 35–37]. При этом она может быть использована не только в качестве носителя клеток, но и в виде хорошего субстрата для покрытия поврежденной поверхности глазного яблока.

Еще одной перспективной подложкой является фибриновый субстрат, который первыми использовали P. Rama и соавт. в 2001 г. [38]. Его особенностью является способность рассасываться после трансплантации на поврежденную роговицу.

В литературе имеются также сообщения об использовании для культивирования подложки из синтетического термочувствительного полимера, которая при ее охлаждении до $+20^\circ\text{C}$ позволяет легко отделить полученный монослой клеток [39].

Несмотря на широкое использование AM, фибрина и термочувствительного полимера в качестве субстрата для культивирования, к настоящему времени продолжают исследования по разработке новых альтернативных подложек, среди которых перспективными являются биосинтетические, сшитые кросслинкингом коллагеновые скаффолды [40], извлеченный из скелетных мышц

миогель [41], кератиновые пленки [42] и гидрогели хитозана [43]. Предлагается использовать и синтетические подложки, такие как мягкие контактные линзы [44], нановолокна [45] и электроплетеные 3D-каркасы [46].

Источники клеточного материала для культивирования. Основным источником ЛЭСК, безусловно, является зона их физиологической локализации. Трансплантация культивированных ЛЭСК (cultured limbal epithelial transplantation, CLET) начинается с работы J. Rheinwald и H. Green [47], которые доказали возможность *ex vivo* культивирования ЛЭСК.

Первыми, кто применил технологию трансплантации культивированных ЛЭСК в клинике, были G. Pellegrini и соавт. [25]. Они в 1997 г. использовали аутологичный лимбальный биоптат размером 1 × 2 мм, взятый со здорового глаза пациента, и успешно вырастили монослой клеток роговичного фенотипа, который был применен для трансплантации на поврежденный глаз.

Аутологичная CLET является эффективным способом лечения односторонней ЛН [48]. Она создает условия для длительного поддержания камбиального резерва роговицы. Так, в 2010 г. P. Rama и соавт. [49] сообщили о том, что трансплантированные ЛЭСК в более чем 75 % случаях сохраняют свою работоспособность на срок до 10 лет.

Вместе с тем в литературе имеются сообщения о нередких случаях рецидива конъюнктивализации после трансплантации культивированных аутологичных ЛЭСК. Так, T. Nakamura и соавт. в 2016 г. сообщили, что во всех случаях применения аутологичной CLET, несмотря на успешную реконструкцию роговичного эпителия, в той или иной степени наблюдалась легкая периферическая конъюнктивализация [3]. Тем не менее сохранение прозрачности центральных областей роговицы и наличие стабильного роговичного эпителия убедительно подтверждают эффективность трансплантации культивированных ЛЭСК при лечении тяжелых случаев односторонних патологий глазной поверхности, осложненных ЛН. Вместе с тем выполнение аутологичной CLET невозможно при тяжелой двусторонней ЛН, так как в таких условиях отсутствуют источники ЛЭСК.

В сложившейся ситуации одним из альтернативных источников для CLET являются лимбальные зоны кадаверных глаз. Первым трансплантацию культивированных кадаверных ЛЭСК применили I. Schwab и соавт. в 2000 г. [50], доказав, что такая трансплантация позволяет восстановить зрение пациентам и добиться стабильной эпителизации роговицы на срок до 19 мес. Кроме того, имеются данные о том, что при тяжелых двусторонних поражениях глазной поверхности выполнение аллогенной CLET может быть успешно как в острой фазе (для скорейшего покрытия поврежденных тканей и уменьшения воспаления), так и в хронической (для улучшения остроты зрения) [3, 34].

Используя такую тактику и иммуносупрессивную терапию, японские ученые трансплантировали культивированные аллогенные ЛЭСК на 39 глазах пациентов с тяжелыми формами различных заболеваний глазной поверхности, добившись в большинстве случаев сохранения прозрачности роговиц и стабилизации их эпителия в течение 3 лет. Вместе с тем в некоторых случаях в течение нескольких лет после аллогенной CLET фенотип трансплантированных от донора СК постепенно менялся на аналогичный эпителиоцитам реципиента [3]. Это явление авторы объясняют отторжением трансплантированных клеток и делают акцент на необходимости проведения иммуносупрессивной терапии у пациентов с аллогенной CLET для повышения выживаемости трансплантата.

Таким образом, для восстановления эпителия роговичного фенотипа у пациентов с двусторонней тотальной ЛН объем медицинской помощи на сегодняшний день ограничивается аллогенной трансплантацией ЛЭСК, связанной с необходимостью применения иммуносупрессивной терапии. При этом аллогенная CLET не исключает рецидива конъюнктивализации роговицы. Поэтому в настоящее время достаточно остро стоит вопрос об альтернативных источниках камбиальных эпителиоцитов.

В свете «теории о филогенетически обусловленной регенерации» [51] таким источником может служить буккальный эпителий полости рта. Высказывается точка зрения, что его эпителиоциты, являясь филогенетически родственной тканью, могут быть гистоморфологически оправданно взаимозаменяемы с роговичными. В иностранной литературе имеются сообщения об успешном применении для лечения тяжелых двусторонних поражений глазной поверхности трансплантации культивированных аутологичных эпителиальных СК слизистой оболочки полости рта (cultivated oral mucosal epithelial transplantation, COMET) [3, 52, 53].

История трансплантации эпителиальных СК слизистой оболочки полости рта начинается с работы R. Denig [54], который в 1912 г. первым предложил использование трансплантата слизистой оболочки щеки. Он использовал ее для восполнения утраченной конъюнктивальной ткани в исходе трахомы или герпетического поражения передней поверхности глаза. Позднее, в 1929 г. [55], он сообщил о выраженном трофическом действии таких трансплантатов на роговицу и предложил круговую пересадку ткани слизистой щеки (Circumcorneal transplantation). Затем P. Ballen [56] в 1963 г. для восстановления роговичной регенерации после тяжелых ожогов глаз выполнил пересадку участка слизистой щеки, содержащего как эпителиальные, так и субэпителиальные ткани. Однако опыт не увенчался успехом и трансплантат подвергся значительной васкуляризации и раннему фиброзу. С нашей точки зрения, неудача P. Ballen

связана с тем, что слизистая пересаживалась вместе с субэпителиальными тканями, которые в ротовой полости, как известно, обильно васкуляризованы. Таким образом, метод был признан неэффективным, что надолго отодвинуло развитие трансплантации эпителиоцитов ротовой полости.

Воскрешение этой методики произошло 1986 г., как раз в разгар развития ЛТ, когда активно начали предлагаться различные варианты пересадки тканей глазной поверхности. В этот период I. Gipson и соавт. [57] в эксперименте пересадили эпителий слизистой оболочки полости рта на глазную поверхность кроликов, предварительно освободив ее от субэпителиальных тканей путем обработки диспазой II. Такая методика оказалась более удачной, но трансплантация была возможна только в лимбальных областях.

В настоящее время, когда активно развивается тканевая инженерия, *ex vivo* культивирование эпителиоцитов слизистой оболочки щеки (буккального эпителия) представляет особый интерес для реконструктивной хирургии роговицы, поскольку порой остается единственной надеждой для пациентов с тяжелыми двусторонними проявлениями ЛН.

Последние исследования, выполненные в 2003 г. T. Nakamura и S. Kinoshita, свидетельствуют о возможности создания с помощью культивированных буккальных эпителиоцитов сходного по строению с нормальным роговичным эпителием монослоя клеток [52]. Эти знания были использованы в клинике [58]. При этом каких-либо преимуществ или недостатков СОМЕТ перед СЛЕТ не было выявлено, что подчеркивает перспективность данного метода лечения тяжелой двусторонней ЛН.

Таким образом, культивированные эпителиоциты слизистой оболочки полости рта могут функционировать в качестве альтернативного эпителия роговицы, поэтому СОМЕТ может рассматриваться как вполне приемлемый метод реэпителизации роговицы [3]. При этом, ввиду его аутологичности, отсутствует проблема гистосовместимости, что в свою очередь снижает риск послеоперационных осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Устранение ЛН возможно только посредством операции трансплантации ЛЭСК. При односторонней ЛН или при двустороннем поражении, когда на одном глазу ЛН носит частичный характер, вполне эффективной и наиболее безопасной является операция трансплантации культивированных аутологичных ЛЭСК. В случае двусторонней тотальной ЛН наиболее приемлемой операцией, не требующей системной иммуносупрессии, является трансплантация культивированных аутологичных эпителиальных клеток слизистой оболочки полости рта.

Конфликт интересов: отсутствует.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Литература/References

1. World Health Organization. Global data on visual impairments 2010. WHO; 2012: 3–4.
2. Burman S., Tejwani S., Vemuganti G.K., et al. Ophthalmic application of preserved human amniotic membrane: a review of current indications. *Cell Tissue Banking*. 2004; 5: 161–75. <https://doi.org/10.1023/B:CATB.0000046067.25057.0a>
3. Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C., Koizumi N., Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog. Retin. Eye Res.* 2016; 51: 187–207. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.003
4. Holland E.J. Management of limbal stem cell deficiency: a historical perspective, past, present, and future. *Cornea*. 2015; 34: 9–15. doi:10.1097/ICO.0000000000000534
5. Ситник Г.В. Современные клеточные биотехнологии в офтальмологии. Амниотическая мембрана как субстрат для культивирования стволовых эпителиальных клеток. *Белорус. Мед. Журнал*. 2005; 3: 13–6. Sitnik G.V. Modern cellular biotechnology in ophthalmology. Amniotic membrane as a substrate for the cultivation of stem epithelial cells. *Belorus. Med. Zhurnal*. 2005; 3: 13–6 (in Russian).
6. Черныш В.Ф., Бойко Э.В., Шишкин М.М. Лимбальная трансплантация в лечении и зрительной реабилитации пациентов с тяжелыми химическими ожогами глаз. *Вестник офтальмологии*. 2004; 120 (2): 8–11. Chernysh V.F., Boyko E.V., Shishkin M.M. Limbal transplantation in the treatment and visual rehabilitation of patients with severe chemical eye burns. *Vestnik oftal'mologii*. 2004; 120 (2): 8–11 (in Russian).
7. Dua H.S., Saini J.S., Azuara-Blanco A., Gupta P. Limbal stem cell deficiency: Concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J. Ophthalmol.* 2000; 48: 83–92. PMID: 11116520.
8. Grueterich M. Ex Vivo Expansion of Limbal Epithelial Stem Cell: Amniotic Membrane Serving as a Stem Cell Niche. *Surv. Ophthalmol.* 2003; 48 (6): 631–46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2003.08.003>
9. Hazlett L.D. Epithelial desquamation in the adult mouse cornea: A correlative TEM-SEM study. *Ophthalmic Res.* 1980; 12: 315. doi:10.1159/000265095
10. Lavker R. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp. Eye Res.* 2004; 78: 433–46. doi:10.1016/j.exer.2003.09.008
11. Черныш В.Ф., Бойко Э.В. Ожоги глаз: состояние проблемы и новые подходы. СПб.: ВМедА; 2008. Chernysh V.F., Boyko E.V. Eye burns: the condition of the problem and new approaches. Sankt Petersburg: VMedA; 2008 (in Russian).
12. Holland E.J., Schwarz G. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea*. 1996; 15: 549–56. PMID: 8899265.
13. Daya S.M., Chan C.C., Holland E.J. Cornea Society nomenclature for ocular surface rehabilitative procedures. *Cornea*. 2011; 30 (10): 1115–9.
14. Thoft R.A. Keratoepithelioplasty. *Am. J. Ophthalmol.* 1984; 97: 1–6. PMID: 6364814.
15. Kenyon K.R., Tseng S.C. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1989; 96: 709–22. doi: [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(89\)32833-8](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(89)32833-8)
16. Tsai R.J.F., Tseng S.C. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea*. 1994; 13: 389–400.
17. Holland E.J. Epithelial transplantation for the management of severe ocular disease. *Trans Am. Ophthalmol. Soc.* 1996; 94: 677–743. PMID: 8981714 PMID: PMC1312113.
18. Biber J.M., Skeens H.M., Neff K.D., Holland E.J. The Cincinnati procedure: technique and outcomes of combined living-related conjunctival limbal allografts and keratolimbal allografts in severe ocular surface failure. *Cornea*. 2011; 30: 765–71. doi: 10.1097/ICO.0b013e318201467c

19. *Solomon A.* Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2002; 109: 1159–66. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(02\)00960-0](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(02)00960-0)
20. *Rheinwald J.G.* Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975; 6: 331–43. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(75\)80001-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(75)80001-8)
21. *Green H.* Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979; 76 (11): 5665–8. PMID: 293669.
22. *Todaro G.J., Green H.* Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology*; 1963; 17 (2): 299–313. doi:10.1083/jcb.17.2.299
23. *Subhashini S.* Screening of antibacterial and cytotoxic activity of extracts from epidermis and epidermal mucus of *Barbonymus schwanenfeldii* (Tinfoil barb fish). *Int J. Res. Engin. Technol*. 2013; 2 (4): 492–7.
24. *Sun T.T.* Cultured epithelial cells of cornea, conjunctiva and skin: absence of marked intrinsic divergence of their differentiated states. *Nature*. 1977; 269 (5628): 489–93. doi:10.1038/269489a0
25. *Pellegrini G., Traverso C.E., Franzi A.T., et al.* Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997; 349: 990–3. doi:10.1016/S0140-6736(96)11188-0
26. *Sugiyama H., Maeda K., Yamato M., et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2008; 2: 445–9. doi:10.1002/term.111
27. *Omoto M., Miyashita H., Shimmura S., et al.* The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. *Invest. Ophthalmol*. 2009; 50: 2109–15. PMID: 19136703 doi:10.1167/iovs.08-2262
28. *Oie Y., Hayashi R., Takagi R., et al.* A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction. *Br. J. Ophthalmol*. 2010; 94: 1244–50. doi:10.1136/bjo.2009.175042
29. *Nakamura T., Ang L.P., Rigby H., et al.* The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Invest. Ophthalmol*. 2006; 47: 909–16. PMID: 16505023 doi:10.1167/iovs.05-1188
30. *Miyashita H., Yokoo S., Yoshida S., et al.* Long-term maintenance of limbal epithelial progenitor cells using rho kinase inhibitor and keratinocyte growth factor. *Stem Cells Transl. Med*. 2013; 2: 758–65. doi:10.5966/sctm.2012-0156
31. *Friend J.* Corneal epithelial cell cultures on stromal. *Invest. Ophthalmol*. 1982; 23: 41–9.
32. *Tsai R.J., Li L.M., Chen J.K.* Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N. Engl. J. Med*; 2000. 343: 86–93. doi:10.1056/NEJM200007133430202
33. *Koizumi N., Fullwood N.J., Bairaktaris G., et al.* Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2000; 41 (9): 2506–13. PMID: 10937561.
34. *Koizumi N., Inatomi T., Suzuki T., Sotozono C., Kinoshita S.* Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2001; 108 (9): 1569–74. doi: [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(01\)00694-7](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(01)00694-7)
35. *Бойко Э.В., Черныш В.Ф., Абрамова И.А.* Об использовании амниотической мембраны с целью конъюнктивальной пластики в эксперименте. *Офтальмохирургия*. 2004; 3: 8–12. *Boyko E.V., Chernysh V.F., Abramova I.A.* On the use of the amniotic membrane for the purpose of conjunctival plasty in the experiment. *Oftal'mokhirurgiya*. 2004; 3: 8–12 (in Russian).
36. *Endo K.* Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the alpha-5 chain of type IV collagen. *Invest. Ophthalmol*. 2004; 45: 1771–4. doi:10.1167/iovs.03-0952
37. *Solomon A., Rosenblatt M., Monroy D.* Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br. J. Ophthalmol*. 2001; 85: 444–9. PMID: 11264135.
38. *Rama P., Bonini S., Lambiase A., et al.* Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*. 2001; 72: 1478–85. doi:10.1097/00007890-200111150-00002
39. *Nishida K., Yamato M., Hayashida Y., et al.* Functional bio-engineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*. 2004; 77: 379–85. doi:10.1097/01.TP.0000110320.45678.30
40. *Dravida S., Gaddipati S., Griffith M., et al.* A biomimetic scaffold for culturing limbal stem cells: a promising alternative for clinical transplantation. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2008; 2: 263–71. doi:10.1002/term.91
41. *Francis D.* Myogel supports the ex vivo amplification of corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res*. 2009; 88: 339–46. doi:10.1016/j.exer.2008.06.016
42. *Reichl S.* Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2011; 32: 3375–86. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.052
43. *Grolnik M., Szczubialka K., Wowra B., et al.* Hydrogel membranes based on genipin-cross-linked chitosan blends for corneal epithelium tissue engineering. *J. Mater Sci. Mater Med*. 2012; 23: 1991–2000. doi:10.1007/s10856-012-4666-7
44. *Di Girolamo N., Bosch M., Zamora K., et al.* Watson Transplantation. A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction. 2009; 87 (10): 1571–8. doi:10.1097/TP.0b013e3181a4bbf2
45. *Sharma S., Mohanty S., Gupta D., et al.* Cellular response of limbal epithelial cells on electrospun poly-epsilon-caprolactone nanofibrous scaffolds for ocular surface bioengineering: a preliminary in vitro study. *Mol. Vis*. 2011; 17: 2898–910. PMID: 22128237.
46. *Ortega I., Ryan A.J., Deshpande P., et al.* Combined microfabrication and electrospinning to produce 3-D architectures for corneal repair. *Acta Biomater*. 2013; 9: 5511–20. doi:10.1016/j.actbio.2012.10.039
47. *Rheinwald J.G., Green H.* Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975; 6: 331–43. doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(75\)80001-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(75)80001-8)
48. *Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C., et al.* Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol. Scand*. 2004; 82: 468–71. <https://doi.org/10.1111/j.1395-3907.2004.00285.x>
49. *Rama P., Matuska S., Paganoni G.* Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N. Engl. J. Med*. 2010; 363: 147–55. doi:10.1056/NEJMoa0905955
50. *Schwab I.R., Reyes M., Isseroff R.R.* Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea*. 2000; 19: 421–6. PMID: 10928750
51. *Хлопун Н.Г.* Общественно-биологические и экспериментальные основы гистологии. Ленинград: Изд-во АН СССР; 1946. *Khlopin N.G.* General biology and experimental basis of histology. Leningrad: Izd-vo AN SSSR; 1946 (in Russian).
52. *Nakamura T., Kinoshita S.* Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea*. 2003; 22: 75–80. PMID: 14703711.
53. *Nishida K., Yamato M., Hayashida Y., et al.* Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N. Engl. J. Med*. 2004; 351: 1187–96. doi:10.1056/NEJMoa040455
54. *Denig R.* Eine chirurgische Behandlung für Kalkverletzungen des Auges. *Munch. Med. Wochenschr*. 1912; 12: 579–80.
55. *Denig R.* Circumcorneal transplantation of buccal mucous membrane as a curative measure in diseases of the eye. *Arch Ophthalmol*. 1929; 1: 351–7. doi:10.1001/archophth.1929.00810010367007
56. *Ballen P.H.* Mucous membrane grafts in chemical (lye) burns. *Am. J. Ophthalmol*. 1963; 55: 302–12.
57. *Gipson I.K., Geggel H.S., Spurr-Michaud S.J.* Transplant of oral mucosal epithelium to rabbit ocular surface wounds in

Limbal stem cell deficiency: etiology, pathogenesis, principles and prospects of surgical treatment

A.S. Dubovikov — resident

I.O. Gavrilyuk — ophthalmologist

A.N. Kulikov — Dr. Med. Sci., head of the chair of ophthalmology

S.V. Churashov — Dr. Med. Sci., assistant professor of the chair of ophthalmology

V.F. Chernysh — Cand. Med. Sci., assistant professor of the chair of ophthalmology

A.V. Bezushko — ophthalmologist

S.M. Kirov Military Medical Academy, 6, Akademika Lebedeva St., St. Petersburg, 194044, Russia
dubovikovanatolyi@gmail.com

The review is focused on the modern view of the etiology and pathogenesis of limbal stem cells deficiency. The history of development of tissue and ex-vivo transplantation of limbal epithelial stem cells is presented. Certain promising directions of the treatment of patients with limbal stem cells deficiency are presented.

Keywords: cornea, limbal stem cell deficiency, limbal epithelial stem cell, oral mucosal epithelial cells, tissue transplantation, ex-vivo cultivated cells transplantation, tissue engineering

For citation: Dubovikov A.S., Gavrilyuk I.O., Kulikov A.N., Churashov S.V., Chernysh V.F., Bezushko A.V. Limbal stem cell deficiency: etiology, pathogenesis, principles and prospects of surgical treatment. Russian ophthalmological journal. 2019; 12 (1): 103–11 (In Russian). doi: 10.21516/2072-0076-2019-12-1-103-111

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

Financial disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned.