



УДК 57.021:617.713-089.85

Д. П. Скачков, А. Л. Штилерман, О. В. Скачкова

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АМНИОТИЧЕСКОЙ ОБОЛОЧКИ В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ПАТОЛОГИИ РОГОВИЦЫ

*Амурская государственная медицинская академия,
675000, ул. Горького, 95, тел. 8-(4162)-52-08-28, г. Благовещенск*

Резюме

Амниотическая мембрана (АМ) является внутренней плодной оболочкой. В офтальмологии эффективно используется в лечении патологии роговицы. Применяют трансплантацию нативной, консервированной, криоконсервированной, лиофилизированной амниотической мембраны. Биологические свойства обусловлены содержанием в ней большого количества цитокинов, факторов роста, ингибиторов протеаз. АМ практически не содержит HLA – А, В и DR антигенов и поэтому реакция иммунологического отторжения после её трансплантации отсутствует. Благодаря антимикробным свойствам мембрана препятствует послеоперационной инфекции. Амнион также может служить субстратом для выращивания стволовых и эпителиальных клеток. Низкая иммуногенность и отсутствие реакций отторжения, значительное ускорение эпителизации, угнетение ангиогенеза, фиброза и воспаления, восстановление морфологии эпителиального покрова являются существенными преимуществами амниопластики. Применение амниотической оболочки в хирургическом лечении патологии роговицы является перспективным методом лечения.

Ключевые слова: амниотическая мембрана, эпителий, стволовые клетки.

D. P. Skachkov, A. L. Shtilerman, O. V. Skachkova

BIOLOGICAL PROPERTIES OF AMNIOTIC MEMBRANE IN THE SURGICAL TREATMENT OF CORNEA DISEASES

Amur State Medical Academy, Blagoveschensk

Summary

Amniotic membrane (AM) is an internal fetal membrane. It is effectively used in ophthalmology in the treatment of diseases of the cornea. Doctors use transplant native, canned, cryopreserved, lyophilized amniotic membrane. Biological properties are explained by the content of a large number of cytokines, growth factors, protease inhibitors. AM is almost free from HLA - A, B and DR antigens that is why immune rejection response after transplantation is absent. Antimicrobial properties of the membrane prevent postoperative infection. Amnion can also serve as a substrate for growing stem cells and epithelial cells. Low immunogenicity and lack of rejection reactions, significant acceleration of epithelialization, inhibition of angiogenesis, fibrosis and inflammation, restoration of epithelium morphology comprise a significant advantage of amnioplasty. The use of amniotic membrane in the surgical treatment of cornea diseases is a encouraging treatment option.

Key words: amniotic membrane, epithelium, stem cells.

Амниотическая (от греч. amnion – чаша) мембрана (АМ) является самой внутренней плодной оболочкой, которая образует вокруг зародыша полость, заполненную амниотической жидкостью. Как известно, АМ состоит из трех слоев: амниотического эпителия, базальной мембраны и стромы. Строма, в свою очередь, образована компактным слоем, пластом фибробластов

и спонгиозным слоем. Толщина ее варьирует от 0,02 до 0,5 мм [1, 2]. Эпителий АМ представлен одним слоем клеток, изменчивым по форме и высоте. Внеплатцитарная зона АМ выстлана кубическим или уплощенным эпителием, в платцитарной зоне он, в основном, цилиндрический. Амниотический эпителий обладает высокой метаболической активностью. Его цитоплаз-

ма богата липидами (фосфолипиды, лецитин, кефалин, триглицериды и др.), полисахаридами, протеинами, мукополисахаридами, фосфорными соединениями. Кроме того, в ней имеется широкий спектр ферментов, в том числе синтезирующих простагландины: фосфолипазы, простагландин-синтетазы, циклооксигеназы. Эпителиальные клетки содержат также большое количество факторов роста, играющих существенную роль в процессах эпителизации и регенерации тканей. Толстая базальная мембрана расположена под амниотическим эпителием. Гистохимически она представлена сетью ретикулярных волокон и достаточно большим количеством протеогликанов, с высоким содержанием сульфата гепарина. Эти компоненты, по-видимому, выполняют барьерную функцию, регулируя проницаемость АМ. Амнион содержит большое количество коллагена, гиалурона и, преимущественно, малых протеогликанов, таких как бигликан и декорин. Коллаген 1-го, 3-го, 4-го, 5-го и 7-го типов, ламинин и фибронектин найдены в базальной мембране и стромальном амнионе [10, 11, 12]. К. Fukuda, et al. в 1999 г. доказали схожесть структуры ламинина-1,-5, фибронектина и коллагена 7-го типа в базальных мембранах конъюнктивы, роговицы и АМ, что объясняет высокую способность амниона к биоинтеграции в тканях глаза [19].

К базальной мембране прилегает компактный слой стромы, состоящий из переплетающихся, тесно расположенных ретикулярных волокон. За ним следует слой фибробластов и спонгиозный слой [10, 11, 12].

Амнион практически не содержит HLA – А, В и DR антигенов и поэтому реакция иммунологического отторжения после его трансплантации отсутствует.

В офтальмологической практике применяют трансплантацию нативной, консервированной, криоконсервированной, силиковосушенной, лиофилизированной АМ [6, 17]. Что же касается хирургического лечения роговицы, то АМ успешно используется как при ее эпителиальных дефектах, так и в случаях так называемой лимбальной недостаточности. А при поражении ростковой лимбальной зоны амниопластика осуществляется совместно с лимбальной трансплантацией. При этом происходит стимуляция нормальной эпителизации роговицы, уменьшается выраженность воспалительно-пролиферативного процесса в ее ткани [4].

В литературе встречаются противоречивые данные о технике трансплантации АМ. Наиболее часто используется пересадка эпителиальной поверхностью вверх, а стромальной непосредственно к поверхности глазного яблока. При другом способе пересадки АМ, наоборот, укладывают эпителием вниз, а стромой вверх.

Существует несколько принципиально различных способов трансплантации АМ: «inlay» или «overlay».

Техника «inlay». АМ размещают только непосредственно на зону поражения роговицы, не покрывая интактную ее поверхность за пределами эпителиального дефекта, и фиксируют к нему отдельными швами [13, 7, 8]. В результате АМ принимает на себя роль базальной мембраны, на которую и нарастают эпителиальные клетки с окружающей поверхности роговицы. В последние годы появились различные варианты использования данной техники. Например, дополнительно

круглым ножом со стороны стромально-эпителиального дефекта к периферии проводят круговое расслоение роговицы шириной 1,5-2 мм. Трансплантат размещают эпителиальной стороной вверх. С помощью шпателя края трансплантата заправляют в расслоенную строму роговицы [3, 16].

Техника «overlay» подразумевает полное покрытие роговицы с захватом лимбальной зоны. При этой технике АМ выполняет прежде всего роль биологической контактной линзы [16].

Н. К. Полянская и С. Я. Щербаков (2006, 2007) предложили новый метод бесшовного покрытия роговицы амнионом с фиксацией вискоэластиком к мягкой контактной линзе [9, 10]. На внутреннюю поверхность линзы наносят вискоэластик, а на него выкроенный по диаметру линзы силиковосушенный амнион. Мягкую контактную линзу с амнионом (фиксированным вискоэластиком), помещают на поврежденную роговицу.

Эндотелиально-эпителиальная дистрофия роговицы, зачастую развивающаяся в исходе травматичных хирургических манипуляций в передней камере глаза, причиняет пациентам немало страданий. В некоторых случаях (тяжелое общее состояние больного, сомнительный прогноз по восстановлению зрительных функций, высокий риск повторного развития буллезной кератопатии и др.), выполнение кератопластики оказывается неосуществимым. Когда у таких больных невозможно достичь желаемого эффекта консервативными методами лечения, оптимальные результаты дает покровная амниопластика. По данным разных авторов, уже через 1-2 суток после такой операции наблюдается значительное уменьшение боли, светобоязни, слезотечения. Постепенно повышается острота зрения, за счет уменьшения отека роговицы и количества эпителиальных булл [6, 18]. В 2010 году была предложена методика интрастромальной имплантации амниотической мембраны в лечении пациентов с 3-й стадией индуцированной кератопатии [11, 12].

Пересадка АМ нашла свое место также и в лечении пострадавших с ожогами глаз. Покрытие роговицы лоскутом АМ в остром периоде ожоговой болезни оказывает значительный анальгезирующий эффект, снижает выраженность воспалительного процесса, позволяет достичь быстрой эпителизации роговицы и снизить темпы ее васкуляризации [15].

Эффекты, возникающие при трансплантации АМ: предотвращение эпителиального апоптоза, улучшение миграции эпителиальных клеток, улучшение дифференцировки эпителиальных клеток, снижение процессов фиброобразования, угнетение неоваскуляризации [8]. Для объяснения механизмов терапевтического эффекта трансплантации АМ были предложены различные гипотезы. В настоящее время доказанным является тот факт, что консервированная АМ, в отличие от «свежей», представляет собой инертную ткань, не содержащую живых клеток [5, 25]. Способности консервированной АМ 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. Таким образом, име-

ются некоторые различия в степени выраженности тех или иных терапевтических эффектов при применении консервированного и «свежего» амниона. Это дает хирургу возможность выбора в зависимости от потребности конкретного клинического случая.

В АМ обнаруживается множество цитокинов, факторов роста, ингибиторов протеаз, таких как IL-4, 6 и Ю; EGF, FGF, TGF, HGF, и 2-macrobulin [27]. Амнион обладает антимикробным эффектом против ряда микроорганизмов, что обеспечивается формированием физического барьера за счет наличия базальной мембраны, а также присутствием в АМ лизоцима, трансферрина, иммуноглобулина, лактоферрина, специфических антител (появляющихся в 3-м триместре беременности) [1, 2].

Кроме того, АМ также может служить субстратом для выращивания стволовых и эпителиальных клеток [14].

Для культивирования и размножения эпителиальных клеток различных типов *in vitro* требуется наличие соответствующей питательной среды или субстрата, содержащих определенные цитокины, факторы роста и фибробласты (система для культивирования, 3ТЗ – система) [20]. Было показано, что клетки здоровой лимбальной ткани могут быть культивированы в лаборатории и пересажены на глаз с лимбальной недостаточностью для успешной реконструкции глазной поверхности. Впервые о применении этой новой хирургической технологии в клинике сообщил G. Pelligrini D., 1997 г. [21, 22]. В дальнейшем были разработаны различные способы культивирования и установлено, что практически идеальным субстратом для сохранения и размножения лимбальных эпителиальных клеток в культуре является АМ. Концепция привлекла внимание многих исследователей, так как позволяет, посредством достаточно ограниченной биопсии с донорского глаза, избежать определенного риска, связанного с общепринятой техникой.

S. Lee и S. Tseng в экспериментах доказали, что именно базальная мембрана амниона является субстратом, облегчающим миграцию эпителиальных клеток и усиливающим их адгезию. Стимулирует она и дифференцировку клеток, что способствует ускорению процесса эпителизации. Особо следует отметить, что морфология выросших на амнионе эпителиальных клеток идентична нормальным клеткам роговицы или конъюнктивы [24].

Полученные результаты экспериментальных, лабораторных и клинических исследований убедительно доказывают, что стволовые эпителиальные клетки

роговицы и конъюнктивы могут успешно культивироваться *in vitro* на АМ, которая служит уникальным субстратом, обеспечивающим рост и размножение стволовых клеток [23, 26].

S. Tseng и P. Prabhasawat (1997) зафиксировали увеличение количества бокаловидных клеток в зоне трансплантата при использовании амниона для пластики конъюнктивальных сводов [27]. N. Koizumi и J. Shimazaki (2000) на основании данных своих исследований полагают, что эффект активации эпителизации во многом определяется наличием факторов роста в амниотической мембране [26].

Противовоспалительный эффект связывают с тем, что АМ предотвращает инфльтрацию подлежащих тканей полиморфноядерными лейкоцитами, а также с наличием в стромальном матриксе АМ цитокинов-ингибиторов воспаления и тканевых ингибиторов металлопротеаз. В настоящее время угнетение процесса рубцевания при трансплантации АМ объясняют блокированием механизма превращения фибробластов в миофибробласты [4, 13].

Y. Nao (2000) установил, что в эпителиальных и мезенхимальных клетках АМ содержатся мощные антиангиогенные факторы: эндостатин, тромбостатин-1, тканевые ингибиторы металлопротеаз (TIMP-1,-2,-3,-4). Кроме того, АМ образует физический барьер, препятствующий проникновению воспалительных медиаторов и активаторов ангиогенеза в патологический очаг [25].

Выводы

Применение амниотической оболочки в хирургическом лечении патологии роговицы на наш взгляд является перспективным методом лечения. Низкая иммуногенность и отсутствие реакций отторжения, значительное ускорение эпителизации, угнетение ангиогенеза, фиброза и воспаления, восстановление морфологии эпителиального покрова являются существенными преимуществами амниопластики. Возможность длительного хранения материала и использования по экстренным показаниям, а также отсутствие необходимости в дополнительных затратах средств и времени на проведение серологических исследований доноров (роженцы уже обследованы на ВИЧ, сифилис, гепатит В и С), также свидетельствуют в пользу данного метода и необходимости дальнейших исследований, которые помогут более полно раскрыть уникальные свойства амниотической мембраны.

Литература

1. Амбариумян А. В. Многослойная трансплантация амниотической мембраны при нейротрофических язвах различной этиологии // Сборник научных трудов. Российский общенациональный офтальмологический форум. – М., 2009. – Т. 2. – С. 251-255.
2. Батманов Ю. Е., Егоров К. С., Колесникова Л. Н. Применение свежего амниона в лечении заболеваний роговицы // Вестник офтальмологии. – 1990. – Т. 106, № 5. – С. 17-19.
3. Драваджян З. Х., Амбариумян А. В., Овакьян А. В. Применение амниотической мембраны при перфорациях роговицы // Сборник научных трудов. Российский общенациональный офтальмологический форум. – Т. 2. – М., 2009. – С. 280-284.
4. Джураева Ш. У., Гельманова Т. И. Первый опыт пересадки амниотической мембраны в лечении различных заболеваний роговицы // Тезисы докладов Девятого съезда офтальмологов России. – М., 2010. – С. 304.

5. Каспаров А. А. Использование консервированной амниотической мембраны для реконструкции поверхности переднего отрезка глазного яблока // Вестник офтальмологии. – 2001, № 3. – С. 45-46.
6. Каспарова Е. А., Труфанов С. В., Бородин Н. В. Послеоперационная буллезная кератопатия: трансплантационные и нетрансплантационные методы лечения // Тезисы докладов Девятого съезда офтальмологов России. – М., 2010. – С. 307.
7. Новицкий И. Я. Место трансплантации амниотической оболочки в лечении заболеваний роговицы, сопровождающихся неоваскуляризацией // Вестник офтальмологии. – 2003, № 6. – С. 9-11.
8. Новицкий И. Я., Сарахман М. Н., Смаль Т. М. Трансплантация амниотической оболочки с фиксацией в слоях роговицы // Офтальмохирургия. – 2003, № 3. – С. 4-7.
9. Полянская Н. К. Кератоамниопластика в лечении глубоких воспалительных, трофических заболеваний и травм роговицы // Современные методы диагностики и лечения заболеваний роговицы и склеры: науч.-практ. конф.: сб. науч. ст. – Т. 2. – М.: Пульс, 2007. – С. 133-140.
10. Полянская Н. К. Тактика лечения пациентов с язвами роговицы на фоне тяжелой соматической патологии // Клиническая офтальмология. – 2006. – Т. 108, № 1. – С. 14-16.
11. Скачков Д. П., Григоренко А. А., Штилерман А. Л. Морфологические изменения роговицы после интрастромальной имплантации амниона при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы в эксперименте // Якутский медицинский журнал. – 2012, № 2- Якутск, 2012. – С. 41-43.
12. Скачков Д. П., Штилерман А. Л., Григоренко А. А. Влияние интрастромально расположенной амниотической мембраны на роговицу при моделированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии // Мат. VII международной науч.-практ. конф. «Перспективы образования в науке и технике». – 2011. – Польша, 2011. – С. 49-54.
13. Степанов В. К., Иванов О. В. Применение амниотической оболочки в качестве защитного биопокровителя пораженной роговицы и роговичного трансплантата при кератопластике // Тезисы докладов Девятого съезда офтальмологов России. – М., 2010. – С. 319.
14. Ситник Г. В. Современные клеточные биотехнологии в офтальмологии. Амниотическая мембрана как субстрат для культивирования стволовых эпителиальных клеток // Белорусский медицинский журнал. – 2006. – Т. 4, № 18. – С. 15-21.
15. Черныш В. Ф., Бойко Э. В. Ожоги глаз – состояние проблемы и новые подходы. – СПб: ВМедА, 2008. – 135 с.
16. Azuara-Blanco A., Pillai C. T., Dua H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction // Br J Ophthalmol. – 1999. – Vol. 35. – P. 399-402.
17. Dua H. S., Gomes G., King A. The amniotic membrane in ophthalmology // Surv. Ophthalmol. – 2004. – Vol. 49 (1). – P. 51-77.
18. Espana E. M., Grueterich M., Sandoval H. et al. Amniotic membrane transplantation for bullous keratopathy in eyes with poor visual potential // J. Cataract Refract. Surg. – 2003. – Vol. 29. – P. 279-284.
19. Fukuda K., Chikama T., Nakamura M. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva // Cornea. – 1999. – Vol. 18. – P. 73-79.
20. Koizumi N., Inatomi T., Suzuki T. Cultivated epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders // Ophthalmology. – 2001. – Vol. 108 (9). – P. 1569-1574.
21. Pelligrini G., Traverso C. E., Franzi A. T. et al. Long-term restoration of damaged corneal surface with autologous corneal epithelium // Lancet. – 1997. Vol. 349. – P. 990-993.
22. Pelligrini G., Bondanza S., Guerra L. et al. Cultivation of human keratinocyte stem cell: current and future clinical application // Cell. Eng. – 1998. – Vol. 36. – P. 1-13.
23. Sun T.-T., Green H. Cultured epithelial cells of cornea, conjunctiva and skin: absence of marked intrinsic divergence of their differentiated states // Nature. – 1977. – Vol. 269. – P. 489-493.
24. Tseng S., Prabhasawat P., Lee S. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction // Am. J. Ophthalmol. – 1997. – Vol. 124. – P. 765-774.
25. Kim J. C., Tseng S. C. G. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. – Cornea, 1995.
26. Koizumi N., Inatomi T., Suzuki T. Cultivated epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders // Ophthalmol. – 2001. – Vol. 108 (9). – P. 1569-1574.
27. Kruse F. E., Meller D. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the ocular surface // Ophthalmol. – 2002, Sep, 98(9). – P. 801-810.

Координаты для связи с авторами: Скачков Дмитрий Павлович – канд. мед. наук, врач-офтальмолог АОКБ, тел. +7-924-673-23-95, e-mail: doc8012@rambler.ru; Штилерман Александр Леонидович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой глазных болезней АГМА; Скачкова Ольга Владимировна – канд. мед. наук, ассистент кафедры акушерства и гинекологии АГМА.

