

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА EX VIVO РАЗМНОЖЕНИ ЛИМБАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ПРИ НЕВРОТРОФИЧНА КЕРАТОПАТИЯ – КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ

Христова Р.<sup>1</sup>, Здравков Я.<sup>1</sup>, Христова М.<sup>2</sup>, Танев И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медицински университет – София, УМБАЛ Александровска, Клиника по Очни болести

<sup>2</sup>УМБАЛ Александровска, Клиника по Неврология, Медицински университет – София, Катедра по  
Клинична лаборатория и клинична имунология

### Transplantation of ex vivo expanded limbal stem cells in neurotrophic keratopathy – a case report

Hristova R.<sup>1</sup>, Zdravkov Y.<sup>1</sup>, Hristova M.<sup>2</sup>, Tanev I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical University – Sofia, University Hospital Alexandrovska, Department of Ophthalmology

<sup>2</sup>University Hospital Alexandrovska, Clinic of Nephrology, Medical University – Sofia, Department of Clinical  
Laboratory and Clinical Immunology

#### Резюме

Представяме клиничен случай на невротрофична кератопатия, асоциирана с унилатерална лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Извършена бе трансплантация на автоложни ex vivo размножени лимбални стволови клетки. Използваните диагностични методи включват биомикроскопия, микробиологично изследване на секрет от конюнктива и роговична лезия, полимеразно верижна реакция на преднокамерна течност за херпес вирусна ДНК, оптична кохерентна томография на преден очен сегмент. Поради липсата на подобрение след консервативно лечение се проведе минимално инвазивна лимбална биопсия и трансплантация на амниотична мембрана. Получените автоложни стволови клетки бяха размножени ex vivo по иновативен протокол без ксенобиотични продукти с преносител нативна амниотична мембрана. След получаване на достатъчно епителни слоеве ex vivo, се направи биологично покритие с готовия трансплантат. Постоперативно роговичната повърхност бе напълно епителизирана и зрителната острота се подобри значително. Наблюдава се регрес на неоваскуларните съдове и всички симптоми на хронично възпаление се облекчиха. Трансплантацията на автоложни ex vivo размножени лимбални стволови клетки с преносител амниотична мембрана може да бъде ефективен метод за лечение на невротрофична кератопатия, асоциирана с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

**Ключови думи:** трансплантация, лимбални стволови клетки, невротрофична кератопатия, лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

#### Abstract

We present a case of neurotrophic keratopathy associated with limbal stem cell deficiency, treated by transplantation of autologous ex vivo expanded limbal stem cells. The applied diagnostic methods include slit-lamp examination, microbiological samples from conjunctiva and corneal lesion, polymerase chain reaction of aqueous humor for herpes virus DNA, anterior segment optical coherence tomography. Since no improvement was observed with conservative treatment, a minimally invasive limbal biopsy and transplantation of amniotic membrane were performed. The collected autologous limbal stem cells were expanded ex vivo using an

#### Адрес за кореспонденция:

Медицински университет – София, УМБАЛ  
Александровска, Клиника по Очни болести  
ул. "Св. Георги Софийски" № 1, София 1431

**Автор за кореспонденция:** Розалия Христова  
ул. „Бурел“, бл. 72А, вх. Б, ап. 37, София 1408

#### For correspondence:

Medical University – Sofia, University Hospital Alexandrovska,  
Department of Ophthalmology  
1, Georgi Sofiyski Str., Sofia 1431

**Corresponding author:** Rozaliya Hristova  
72A, Burel Str., app. 37, Sofia 1408

innovative protocol without xenobiotic products on intact amniotic membrane. After sufficient epithelial layers were obtained ex vivo the graft was transplanted on the ocular surface of the patient. Postoperatively the corneal surface was completely covered by epithelium, visual acuity improved significantly. Regression of neovascular vessels was observed and all symptoms of chronic inflammation were alleviated. Transplantation of ex vivo expanded limbal stem cells on amniotic membrane can be an effective treatment method for neurotrophic keratopathy, associated with limbal stem cell deficiency.

**Key words:** transplantation, limbal stem cells, neurotrophic keratopathy, limbal stem cell deficiency.

### Въведение

Невротрофичната кератопатия е дегенеративно заболяване на роговицата. Може да е резултат от локални процеси като вирусни кератити (херпес симплекс и зостер), химични изгаряния, оперативни интервенции на очната повърхност. Някои системни заболявания също увреждат роговичната инервация – диабет, мултипла склероза и други [8].

Първата структура, която се засяга е епителът с редуция на митотичните и метаболитните процеси в клетките [10, 13]. Експозираните без епител роговични структури могат да прогресират до язва, десцеметоцеле и перфорация.

Невротрофичната кератопатия уврежда лимбалните неври, които участват във формирането на нишата на епителните стволови клетки (Limbal epithelial stem cells - LESC), отговорни за роговичната регенерация. В случаи на невротрофична кератопатия, асоциирана с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция се получава порочен кръг – невротрофичното увреждане на лимбалните клетки води до дефицита им, което от своя страна води до хронично възпаление. Механичното дразнене допълнително уврежда регенерацията на нервните окончания [1,2] и процесът се повтаря и задълбочава. Този механизъм изчерпва регенераторните възможности и води до възникване на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Клиничната находка

включва признаци на хронично възпаление, неоваскуларизация и конюнктивализация на роговицата, с последващите от това намалена прозрачност на роговицата, изразен дискомфорт и силно влошаване на зрението.

Лечението при леките степени на невротрофична кератопатия е консервативно с изкуствени слъзи, матрикс-регенеративна терапия, някои растежни фактори – нервен растежен фактор, инсулиноподобен растежен фактор-1 и други. При развиване на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция и засягане на зрителната ос оперативното възстановяване на очната повърхност е с по-добър ефект [4].

Основен интерес представлява използването на автоложни ex vivo размножени лимбални епителни стволови клетки, които могат да се получат след минимално инвазивна лимбална биопсия. Предимството е, че рискът от индуциране на инсуфициенция на донорното око е минимален, а полученият трансплантат е с автоложен произход, което не налага имunosупресия. Основна насока в развитието на метода е създаване на биологично безопасен продукт чрез заместването на всички продукти от животински произход и спазване на Практиката за добро производство при разработването на хранителните среди [9].

### Клиничен случай

Представяме клиничен случай на невротрофична кератопатия, асоциирана с тежка, час-

тична, унилатерална инсуфициенция на лимбални стволови клетки. Седемдесет и една годишен пациент с оплаквания от замъглено зрение, дразнене и болка в ляво око постъпва в Клиника по Очни болести, УМБАЛ „Александровска“ с диагноза кератит на ляво око. Зрителната острота бе VOD= 0.25, VOS=0.02, вътреочното налягане – TOD=17, TOS=TN (палпаторно). Обективно се наблюдава оток на клепачите, блефароспазъм, изразена конюнктивна инекция. Роговицата бе с понижена прозрачност, неправилен рефлекс, променена сетивност в сравнение с незасегнатото око, обширни епителни лезии, задържащи флуоресцеин, секторно заличени палисади на Vogt и периферна дълбока неоваскуларизация (Фигура 1.А). Проведе се оптична кохерентна томография на преден очен сегмент (Topcon 3D OCT-2000FA, Radial Anterior seg., Line Anterior seg.), която демонстрира епителни дефекти и умерена стромална хиперрефлексивност (Фигура 1.В). В зоната на 12ч. не се наблюдаваха изменения (Фигура 1.С).

Изследваха се микробиологични проби на секрет от конюнктива и роговична лезия. Проведена бе полимеразно верижна реакция (Polymerase chain reaction – PCR) на преднокамерна течност за наличие на херпес симплекс тип 1 и 2, варицела зостер и цитомегаловирусна ДНК. Всички проби бяха отрицателни, с което се отхвърли инфекциозната генеза на заболяването.

Предвид наличието на системни заболявания – неинсулинозависим диабет с диабетна полиневропатия, болест на Паркинсон и хроничен алкохолизъм се постави диагноза невротрофична кератопатия.

Поради липса на ефект от консервативното лечение, силно изразен дискомфорт на пациента и засягане на зрителната ос се взе решение за оперативно лечение – биологично покритие с амниотична мембрана. Интра-

оперативно се проведе минимално инвазивна лимбална биопсия на засегнатото око в зона със запазена структура на 12ч., след което един слой човешки амнион се адаптира с тъканно лепило (Tisseel Lyo) и бе направена частична тарзорафия.

Полученият биопсичен материал бе обработен в тъканна банка „Биорегенерация“ по иновативен протокол без употреба на ксенобактериални продукти (CnT-Frame culture medium, CELLnTEC), използвайки нативна амниотична мембрана като субстрат. Растежът и видът на клетките се документираха чрез фазово-контрастна микроскопия (Фигура 2). След 14 дни се формираха стабилни епителни слоеве и се пристъпи към биологично покритие с получения автотрансплантат. След освобождаване на тарзорафията се адаптираха два слоя от амниотичната мембрана, преносител на стволови клетки и се фиксираха с шев 10/0.

Резултати: На първия постоперативен ден окото бе спокойно, с добре адаптирано биологично покритие, без патологична секреция. Две седмици след интервенцията все още се наблюдаваха епителни лезии, задържащи флуоресцеин (Фигура 3. А,В). На тридесетия ден очната повърхност бе напълно епителизирана, окото бе спокойно и признаците на възпаление бяха затихнали (Фигура 3.С,Д). Зрителната острота се повиши от 0.02 предоперативно до 0.2 следоперативно. Наблюдава се регрес на неоваскуларните съдове (Фигура 3.Е).

### Обсъждане

Невротрофичната кератопатия е дегенеративно роговично заболяване, което се проявява с намалена роговична сетивност, точковидни епителни лезии, промени в слъзния филм, повърхностна неоваскуларизация, неправилен епителен слой с хиперплазия и зони на ксероза. Промените могат да прогресират до

стромален едем, язва и перфорация.

Диференциалната диагноза включва синдром на сухо око, експозиционна кератопатия, бактериални, вирусни, гъбични кератити и други. За да бъде изключен инфекциозен процес при пациентта, бяха проведени микробиологични изследвания на секрет от конюнктивата и роговична лезия, които не показаха бактериален или гъбичен растеж. При херпес вирусните кератити клиничната картина също може да включва епителни лезии и намалена роговична сетивност. Вирусната генеза на заболяването при представения клиничен случай бе изключена след провеждане на PCR на преднокамерна течност за херпес симплекс тип 1 и 2, варицела зостер и цитомегаловирусна ДНК. Поставена бе диагноза невротрофична кератопатия, асоциирана с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция и със захарен диабет.

**Лечението** при леките степени на невротрофична кератопатия е консервативно. В представения случай консервативното лечение не доведе до подобрене на очния статус и субективните оплаквания.

При невротрофична кератопатия, асоциирана с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция и засягане на зрителната ос оперативното възстановяване на очната повърхност е възможност с добър ефект [4].

Пелегрини и сътр. за първи път трансплантират автоложни ex vivo размножени стволови клетки при лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция [11], като след това методиката претърпява множество модификации. Сравнителното проучване на Ценг и сътр. показва, че до момента няма унифициран протокол за клетъчните култури [14]. Различните автори докладват успеваемост на процедурата от 60-70 до 100%, като основното приложение е насочено към терапията на химични очни из-

гаряния [16]. Основна насока в развитието на метода е създаване на биологично безопасен продукт чрез заместването на всички продукти от животински произход и спазване на Практиката за добро производство при разработването на хранителните среди [9].

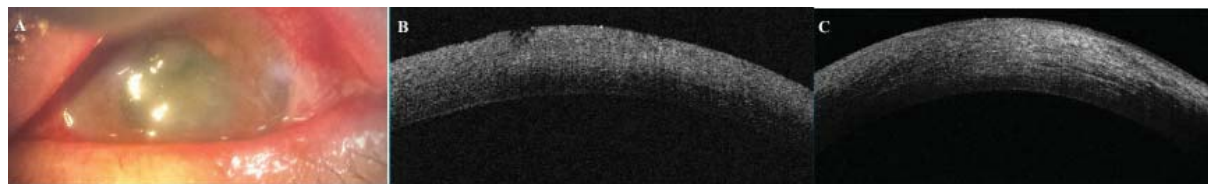
**При представения клиничен случай** за пръв път в България бе проведена трансплантация на автоложни ex vivo размножени LESC. Използван бе протокол, отговарящ на всички съвременни изисквания и стандарти. В случая биопсията бе проведена на засегнатото от процеса око в зона със запазени палисади на Vogt на 12ч. Макар повечето автори да използват незасегнатото око за донор на клетки, Вазириани и сътр. не откриват статистически значима разлика между култури получени от ипси- и контралатералното око в случаи на частична унилатерална инсуфициенция [15].

Въпреки докладвани данни за по-чест неуспех от интервенцията при очи, предварително третирани с амниотична мембрана [12], в случая постигнатият резултат напълно отговаря на критериите за успешна трансплантация – подобрене на зрителната острота, стабилна епителизация, облекчение на дискомфорта и редукция на неоваскуларните съдове.

**В заключение** представяме първия случай на лечение чрез трансплантацията на автоложни ex vivo размножени лимбални епителни стволови клетки с преносител амниотична мембрана, който може да бъде ефективен метод за лечение на невротрофична кератопатия, асоциирана с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.



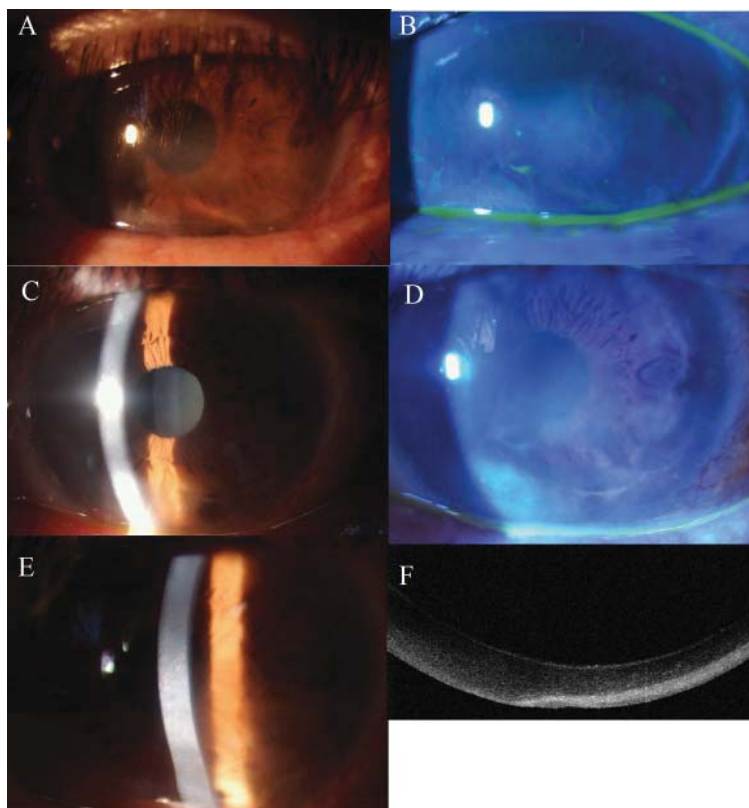
**Фигура 1. Предоперативен статус:** А. Биомикроскопски се наблюдават обширни епителни лезии с неправилен рефлекс и намалена прозрачност на роговицата. В. Оптична кохерентна томография на преден сегмент – епителни лезии и умерено изразена стромална хиперрефлексивност. С. Зоната на 12ч. е без патологични изменения.



**Фигура 2. Фазово-контрастна микроскопия на епителните култури.** А. 7ми ден. В. 10ти ден. С. 14ти ден – формирани са няколко епителни слоя.



**Фигура 3. Постоперативен статус:** На 14-ти постоперативен ден роговицата не е напълно прозрачна, наблюдава се дълбок периферен неоваскуларен съд на 4ч. (А). Все още се наблюдават епителни дефекти (В). На 30-ти постоперативен ден роговицата е опрозрачена. (С) Епителът не задържа флуоресцеин (D). Периферната неоваскуларизация е редуцирана (E). ОСТ на преден сегмент демонстрира пълно възстановяване на дефектите (F).



### Книгопис

1. Бергер Э.Н. Нейрогуморальные механизмы нарушений тканевой трофики, Киев: Здоров'я, 1980, 104.
2. Сперанский А. Д., Элементы построения теории медицины, Москва - Ленинград., Издательство Всесоюзного института экспериментальной медицины, 1937.
3. Bonini S, Rama P, Olzi D, et al. Neurotrophic keratitis. *Eye* 2003;17(8):989-95.
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, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, et al. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol.* 2005;89:529-532.
6. 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.
7. Haagdoorens M, Van Acker SI, Van Gerwen V, et al. Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies. *Stem Cells International*, 2016, 9798374, 22.
8. Hyndiuk RA, Kazarian EL, Schultz RO, Seideman S. Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 1977; 95: 2193-2196.
9. Kalliopi S, DaVida G, Jiayan H, et al. Optimal Isolation and Xeno-Free Culture Conditions for Limbal Stem Cell Function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014;55(1):375-386.
10. Mishima S. The effects of the denervation and the stimulation of the sympathetic and trigeminal nerve on the mitotic rate of the corneal epithelium in the rabbit. *Jpn J Ophthalmol* 1957; 1: 65-73.
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. 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.
13. Sigelman S, Friedenwald JS. Mitotic and wound healing activities of the corneal epithelium: effect of sensory denervation. *Arch Ophthalmol* 1954; 52: 46-57.
14. 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.
15. 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.
16. Zhao Y, Ma L. Systematic Review and Meta-analysis on Transplantation of Ex Vivo Cultivated Limbal Epithelial Stem Cell on Amniotic Membrane in Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*, vol.34 (5), 592-600

Рецензент: Проф. д-р Искра Маждракова д.м.н.