

На правах рукописи

КАЛИННИКОВА СВЕТЛАНА ЮРЬЕВНА

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
НОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОНСТРУКЦИИ ЭПИТЕЛИЯ
РОГОВИЦЫ У ПАЦИЕНТОВ С ОДНОСТОРОННИМ
СИНДРОМОМ ЛИМБАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

3.1.5. – Офтальмология

3.1.14. – Трансплантология и искусственные органы

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

Малюгин Борис Эдуардович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, академик РАЕН, заслуженный деятель науки РФ, заместитель генерального директора по научной работе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Борзенко Сергей Анатольевич - доктор медицинских наук, академик РАЕН, профессор кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, руководитель Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Куликов Алексей Николаевич– главный офтальмолог Министерства Обороны Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор, полковник медицинской службы, начальник кафедры офтальмологии в ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова».

Минина Марина Геннадьевна– доктор медицинских наук, профессор РАН, заведующая Московским координационным центром органного донорства.

Ведущая организация: ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «18» сентября 2023 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 21.1.021.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения роговичная слепота составляет 5,1% среди всех причин слабовидения в мире (Avadhanam V.S., 2014; World Health Organization, Priority eye diseases, Corneal opacities, 2017). В Российской Федерации на долю роговичной слепоты приходится 5,9% от всех причин слабовидения среди взрослого населения и 9% - в структуре инвалидности по зрению. По данным мониторинга 51 региона Российской Федерации (за 2012 год) в структуре роговичной слепоты 37% занимает кератит, 27% кератоувеит, 21% рубцы и помутнения роговицы, 9% язва роговицы, 6% дистрофии роговицы (Нероев В.В. 2020).

Синдром лимбальной недостаточности (СЛН) – это нарушение способности стволовых клеток к пролиферации вследствие травмы, ожога, аутоиммунных и воспалительных заболеваний (Тонаева Х.Д., Онищенко Н.А., Борзенко С.А. 2011). Клинические проявления данной патологии связаны с возникновением персистирующих и рецидивирующих эпителиальных дефектов роговицы. В связи с полным или частичным отсутствием источника регенерации роговичного эпителия, происходит миграция бокаловидных клеток/ткани конъюнктивы на поверхность роговицы, что сопровождается вращением новообразованных сосудов, с формированием фиброваскулярного паннуса и, в тяжелых случаях, тотальным помутнением роговицы (Puangsrichareern V., Tseng S.C. 1995, Sacchetti M., Lambiase A., Cortes M. 2005). В результате, в пораженном глазу происходит значительное снижение зрительных функций, появляется светобоязнь, возникает хронический болевой синдром (Deng S., Sejpal K., Bakhtiari P. 2013). Данная клиническая картина существенно снижает качество жизни и социальную адаптацию пациента.

Немаловажной проблемой является низкая осведомленность врачей о данной патологии, что связано с отсутствием единого диагностического алгоритма обследования и как следствие, вызывает трудности в постановке правильного диагноза. Отечественными и зарубежными авторами предложено обилие

лабораторных методов диагностики СЛН, однако далеко не многие из них дают точное представление о фенотипе клеток, покрывающих роговицу, а именно о наличии бокаловидных клеток (БК) конъюнктивального происхождения (Чирский В.С., Чурашов С.В и соавт. 2016), а также об экспрессии специфических кератинов (К) (Krenzer KL, Freddo TF. 1997) и муцинов (Barbaro V; Ferrari, S. 2010). Для реконструкции эпителия роговицы при одностороннем СЛН применяются различные варианты контралатеральной трансплантации лимба (Sangwan V.S., 2012; Holland E. J., 2015; Черныш В.Ф., 2017), включая культивированные клетки эпителия роговицы (Rama P., 2010; Zakaria N., 2014). Одним из перспективных направлений является бесклеточная технология аутотрансплантации лимбальных стволовых клеток (Malyugin B, et al., 2020).

Большинство из перечисленных выше методов являются высоко травматичными, либо недостаточно эффективными. Использование в клинической практике клеточных технологий не имеет соответствующих разрешений на территории Российской Федерации. Также на сегодняшний день не предложено комбинированного лечения, подходящего для пациентов с истонченными бельмами. Все вышеприведенные проблемы определили цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования

Разработать в эксперименте и обосновать в клинике новую технологию реконструкции эпителия роговицы у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности.

Задачи исследования

1. Изучить в эксперименте *ex vivo* фенотип и иммуно-фенотип клеток от лимбальных роговичных трансплантатов при культивировании на специфических культуральных средах, а также особенности роста клеток от лимбального трансплантата фиксированного в интрастромальном туннеле по поверхности стромы и Боуеновой мембраны на кадаверных роговицах человека.

2. На основании иммуноферментного анализа изучить особенности цитокинового профиля слезной жидкости у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности в зависимости от этиологии и сроков заболевания.

3. На основании иммуноцитохимического исследования разработать протокол импрессионной цитологии с флюоресцентным окрашиванием для выявления специфических кератинов с целью дифференциальной диагностики синдрома лимбальной недостаточности.

4. Разработать варианты хирургической техники ауто трансплантации фрагментов лимба у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности с использованием мануальных и фемтосекундных лазерных технологий.

5. На основании клинических исследований определить эффективность, безопасность и стабильность результатов операции ауто трансплантации фрагментов лимба с или без проведения кератопластики на отдаленных сроках (до 12 месяцев) послеоперационного периода, а также разработать алгоритм диагностики и выбора тактики хирургического лечения пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности.

Научная новизна

1. Впервые в эксперименте *ex vivo* произведена оценка роста и определен фено- и иммуно-фенотип клеток полученных из лимбальных роговичных трансплантатов при культивировании на специфических культуральных средах, который подтверждает рост незрелых лимбальных эпителиальных стволовых клеток вне зависимости от вида культуральной среды, проведение моделирования процессов ре-эпителизации по поверхности стромы и Боуеновой мембраны на кадаверных роговицах, выявило рост клеток вне зависимости от поверхности роговицы.

2. Впервые в Российской Федерации разработан протокол импрессионной цитологии эпителия роговицы, основанный на флюоресцентном окрашивании и выявлении специфических кератинов для верификации происхождения

эпителиальных клеток и подтверждения наличия синдрома лимбальной недостаточности.

3. Впервые изучены особенности цитокинового профиля слезной жидкости пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности до и после оперативного вмешательства, выявлена их зависимость от этиологии заболевания и корреляция уровней цитокинов с прогнозом результативности лечения. Цитокиновый профиль показал высокую взаимосвязь этиологии возникновения синдрома лимбальной недостаточности (ожог кислотой и щелочью) с наибольшей концентрацией провоспалительных цитокинов в дооперационном периоде и на сроках до 3-х месяцев после лечения, что находит отражение в клинической картине течения заболевания и эффективности проведенного лечения.

4. Впервые разработаны и апробированы в практике новые варианты хирургической техники простой бесклеевой лимбальной эпителиальной трансплантации у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности с использованием мануальных и фемтолазерных технологий.

5. Впервые разработан пошаговый алгоритм дооперационной диагностики и выбора тактики хирургического лечения пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности.

Практическая значимость

1. Культивирование клеток от лимбальных трансплантатов показало, что в группе контроля рост клеток был выявлен в обеих средах, однако в среде Epilife фенотипический рост эпителиальных клеток превалировал. Экспериментальное моделирование процессов ре-эпителизации на кадаверных роговицах показало, что вне зависимости от поверхности (строма или Боуменова мембрана), рост клеток от лимбальных трансплантатов наблюдается во всех случаях, при этом к 24 дню культивирования по данным иммуногистохимического анализа выявлен рост преимущественного зрелых эпителиальных клеток.

2. Цитокиновый профиль слезной жидкости у пациентов с односторонним СЛН показал высокую взаимосвязь этиологии заболевания (ожоги кислотой и

щелочью) с наибольшей концентрацией провоспалительных цитокинов как в дооперационном периоде, так и на сроке до 3-х месяцев после лечения, что находит отражение в клинической картине течения заболевания и результативности проведенного лечения.

3. Разработана методика забора мазков-отпечатков с поверхности роговицы и протокол окрашивания полученных образцов с выявлением специфических конъюнктивальных и роговичных кератинов необходимых для дифференциальной диагностики синдрома лимбальной недостаточности.

4. Разработаны варианты хирургической техники простой бесклеевой лимбальной эпителиальной трансплантации с использованием мануальных и фемтолазерных технологий, которые являются эффективными в лечении пациентов с различными вариантами одностороннего синдрома лимбальной недостаточности.

5. Анализ состояния роговицы на различных сроках до- и послеоперационного периода показал достижение ее полной эпителизации роговицы в 75% случаев к сроку 12 месяцев после операции, что подтверждает высокую эффективность заявляемых хирургических методик.

6. Разработан пошаговый алгоритм дооперационной диагностики и выбора тактики хирургического лечения пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности позволяющий верифицировать диагноз и осуществить выбор оптимального метода лечения данного заболевания.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанная технология реконструкции эпителия роговицы заключающаяся в аутологичной пересадке лимбальных эпителиальных стволовых клеток с предварительным выравниванием поверхности роговицы пораженной роговицы микробором, применением низкоэнергетического фемтосекундного лазера на этапе формирования туннелей, одномоментной передней послойной кератопластики с лимбальной ауотрансплантацией без использования фибринового клея и амниотической мембраны, является эффективной в лечении

пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности и способствуют стойкой ре-эпителизации роговицы.

2. Разработанная методика импрессионной цитологии заключающаяся в проведении иммуноцитохимического исследования является прижизненным и достоверным методом диагностики синдрома лимбальной недостаточности. Выявлено, что наиболее высокой специфичностью к конъюнктиве обладает кератин 7, обнаружение которого на поверхности роговицы свидетельствует о наличии синдрома лимбальной недостаточности. Маркером, характерным для роговичного эпителия является кератин 12, обнаружение которого на поверхности роговицы совместно с кератином 7 может наблюдаться при неполном синдроме лимбальной недостаточности. Обнаружение только кератина 12 исключает диагноз синдрома лимбальной недостаточности.

Внедрение в практику

Разработанная методика внедрена в практическую деятельность головной организации и филиалов ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Экспериментальные исследования были выполнены на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем, клиническая часть работы осуществлена на базе отдела оптико-реконструктивной и трансплантационной хирургии переднего отрезка глазного яблока ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Апробация результатов исследования

Результаты работы доложены на: 25-м Конгрессе Европейского общества катарактальных и рефракционных хирургов (ESCRS) (Амстердам, 2021), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Корнеа 2021" (Сочи, 2021), Юбилейной конференции «Общая и военная офтальмология» (С.Петербург, 2021), конференции «Роговица V. Новые достижения и перспективы» (Москва 2021 г.), конференции «Лазерная интраокулярная и рефракционная хирургия» (С.Петербург, 2021), 26-м Конгрессе

Европейского общества катарактальных и рефракционных хирургов (ESCRS) (Португалия, 2022), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (Москва, 2021), 21-й Всероссийском научно-практическом конгрессе с международным участием "Современные технологии катарактальной, рефракционной и роговичной хирургии» (Москва, 2021). Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (Москва, 2022), I-м Дальневосточном офтальмологическом саммите (Владивосток, 2022). 22-м Всероссийском научно-практическом конгрессе с международным участием «Современные технологии катарактальной, рефракционной и роговичной хирургии» (Москва, 2022). Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (Москва, 2023).

Публикации

По материалам исследования опубликовано 5 печатных работ, из них 3 в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, и 2 статьи в журналах, входящих в международную базу данных «Scopus», получены 5 патентов Российской Федерации на изобретение и 3 заявки на патент РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 194 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов и заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 51 рисунками и 22 таблицами. Список литературы содержит 157 источников из них отечественных 23 и иностранных 134.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть исследования

Определение иммунофенотипа клеток из культивированных лимбальных трансплантатов. Часть 1.

Для определения иммунофенотипа клеток были взяты по 8 кусочков лимбальных микротрансплантатов (от донорских роговиц 3А), и посажены в две чашки Петри под покровное стекло. Культуру ЛСК получали методом миграции клеток из кусочков лимба донорских роговиц с использованием двух видов культуральных сред. Для стимулирования роста ЛЭСК использовали среду EpiLife (0,06 мМ Ca^{++}), для стимулирования роста Л-МСК роговицы использовали DMEM/F12 (1,05 мМ Ca^{++}). Культивирование осуществляли 21 день до достижения 70–80% конfluence и пересаживали в лунки слайд-флаконов, проводили их фиксирование и окраску – иммунофенотипирование (на маркеры: эпителия роговицы K3, K12; базальных клеток эпителия K19, интегрин 1b; пролиферативной активности Ki 67; плотных межклеточных контактов коннексин 43, ZO-1; наличия ЛЭСК в культуре ABCG2; перехода мезенхимоподобных клеток в эпителий – виментина) и проточную цитофлюориметрию (на маркеры стволовости - CD 34; эпителиальных клеток CD 29 и Л-МСК клеток CD 73, CD 90, CD 105).

Экспериментальное моделирование и изучение процессов ре-эпителизации ЛЭСК в эксперименте *ex vivo*. Часть 2.

Для выполнения моделирования ре-эпителизации использовали кольцевидный трансплантат лимба (взятый от двух роговиц одного донора 3А), который фрагментировали на равное количество прямоугольных микротрансплантатов (являющихся источником аутологичных ЛСК для двух частей эксперимента). У одной пары роговиц микрокератомом были удалены эндотелий с частью стромы, после чего оставшуюся роговицу выворачивали стромой вверх и обозначали как (“роговица БМ–“), вторая пара оставалась с сохранённой БМ и эндотелием (“роговица БМ+“). На каждой роговице

формировали 8 туннелей в которые имплантировали микро-трансплантаты случайным образом. Культивирование проводили в стандартных условиях в течение 24 дней в среде EpiLife. Далее роговицы фиксировали в растворе нейтрального 10% формалина и делили на 3 равных части: с первой выполнялось гистологическое исследование (гематоксилин-эозин), вторая часть использовалась для СЭМ, с третьей частью было произведено ИГХ исследование на маркеры эпителия K3, K12, K19; пролиферации p63; и Л-МСК клеток CD90, CD105.

Клиническая часть исследования

В клиническое исследование вошло 24 пациента (24 глаза) с равным соотношением мужчин и женщин, средний возраст составил 32,5 года. Сопутствующей патологией явились: катаракта 29,2 %; предшествующая СКП 12,5% и реконструкция сводов 20,8%, посттравматическая афакия 4,2%; По этиологии СЛН щелочной ожог составил 37,5%; кислотный 33,3%; спиртовой 16,7%; термический 8,3%; кератит 4,2%; По типу СЛН полный наблюдался у 62,5%; неполный у 9%; Стадии СЛН были выставлены в соответствии с общепринятой классификацией (Deng, 2019) и составили: 1 стадия 8,3%; 2 стадия 29,2%; 3 стадия 62,5%.

Оценка клинических исходов

Первичные критерии эффективности – *благоприятный исход лечения* (клинический успех) – наличие стабильного эпителия на поверхности роговицы и отсутствие конъюнктивализации в оптической зоне по данным биомикроскопии и количественной оценки площади эпителизации в % соотношении по программе Fiji (ImageJ 2.0.0-rc69/1.52) (Schindelin J., 2012). *Сомнительный исход лечения* – рецидив частичной конъюнктивализации и неоваскуляризации роговицы, не затрагивающие центральной 5 мм зоны роговицы. *Неблагоприятный исход лечения* – рецидив фиброваскулярного паннуса, вторгающегося в оптическую зону, рецидив(-ы) эрозии роговицы.

Вторичные критерии эффективности - система балльной оценки состояния роговицы при биомикроскопии глаза с СЛН, описанная Campbell и соавт. (2019) по

критериям: а) окрашивание эпителия (нмФЛ); б) конъюнктивализация; в) неоваскуляризация; г) помутнение. Каждый параметр оценивали по шкале от 0 (условная норма) до 3 (тяжелое поражение) и рассчитывали общий балл (максимум 12). Оценку роговицы проводили три офтальмолога независимо друг от друга.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 10 («StatSoft», США) и Microsoft Office Excel 2016 («Microsoft», США). Характер распределения данных оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. Данные представлены в формате $Me (Q1; Q3)$, где Me – медиана, $Q1$ и $Q3$ – нижний и верхний квартили соответственно, а также в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD (Standard Deviation) – стандартное отклонение. Сравнение значений до и после операции проводили с использованием критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты экспериментального определения иммунофенотипа клеток из культивированных лимбальных трансплантатов. Часть 1.

В результате 21 дня культивирования эксплантов лимба в двух культуральных средах выход первичных клеток был зарегистрирован на 7-е сутки от посева. Клетки распространялись конгломератом от экспланта во все стороны и имели плотные контакты, полигональную форму, крупное ядро, наблюдался более активный рост смешанных и эпителиальных клеток. На 14 день клетки имели тенденцию к росту и делению на расстоянии от трансплантата. На 21 день рост эпителиальных клеток в среде EpiLife превалировал.

Имуно-фенотип первичной культуры клеток из лимбальных трансплантатов

ИЦХ исследование первого пассажа показало, что маркеры K3, K12, K19 в среде EpiLife являются отрицательными или слабо положительными в среде для DMEM/F12, интегрин 1b был отрицателен в обеих средах. Коннексин 43 и ZO-1

экспрессировали умеренно, что говорит в пользу высокого содержания недифференцированных ЛЭСК. Виментин был положителен в обеих средах (по данным CellProfiler), однако в среде DMEM/ F12 указанный маркер имел более высокую экспрессию, что говорит об эпителиально-мезенхимальном переходе клеток в окрашенном первичном пассаже ЛЭСК. С целью подтверждения сохранности эпителиального фенотипа клеток дальнейшее исследование (2 часть эксперимента) были выполнены в среде EpiLife. Положительная экспрессия маркеров p63 и Ki 67 по медиане составила 85,0%, 61,9%, а маркера ABCG2 97,0% соответственно, что характеризует культуру как активную и состоящую из ЛЭСК.

Проточная цитофлуориметрия первичной культуры клеток из лимбальных трансплантатов

По результатам анализа были отмечены высокое содержание клеток, экспрессирующих CD 73, 90, 105, а также CD 29. Это говорит о том, что первый пассаж клеток имеет высокий потенциал для пролиферации, высокий уровень стволовости и выраженную экспрессию маркера эпителиальных клеток CD 29. Маркер CD 34 не экспрессировался, что характерно как для МСК, так и для ЛЭСК. По данным ИЦХ анализа и проточной цитофлуориметрии, культура клеток, полученная из эксплантов лимба роговицы, характеризуется как популяция содержащая в своём абсолютном большинстве ЛЭСК, необходимые для полноценной эпителизации роговицы при СЛН.

Результаты ex vivo экспериментального моделирования аутотрансплантации фрагментов лимба с парного донорского глаза по различным поверхностям роговицы. Часть 2.

Результаты гистологического исследования роговиц с «БМ+» и «БМ».

Результаты гистологического среза роговицы «БМ-» и «БМ+», показали, что пролиферация клеток распространяется от места имплантации лимбального трансплантата и покрывает как строму, так и БМ с переходом через срез стромы на противоположную сторону. В пролиферате эпителия отмечаются признаки

дифференцировки, среди клеток отчетливо виден базальный слой и 1-2 последующих ряда (с правильной вертикальной стратификацией).

Результаты СЭМ 2/3 части роговиц с «БМ+» и «БМ-».

При анализе обзорных снимков СЭМ роговиц обеих групп, была выявлена четкая визуализация границ лимбального трансплантата, расположенного в интрастромальном туннеле, верхняя часть которого плотно прилегала к поверхности роговицы. Отмечался выход эпителио-подобных клеток из просвета канала и зоны прилегания трансплантата, распространение клеточного монослоя наблюдалось преимущественно от периферии к центру роговицы. Существенных различий между образцами «БМ+» и «БМ-» выявлено не было.

Результаты ИГХ исследования роговиц с «БМ+» и «БМ-».

ИГХ окрашивание срезов роговицы проводили в зоне визуализации трансплантата в интрастромальном туннеле. Результаты экспрессии исследуемых маркеров на роговицах с «БМ+» и с «БМ-» были сопоставимы: выявлена положительная экспрессия маркеров К12 (++), К19(+) и р63 (++) что говорит о эпителиальном происхождении клеток и высокой пролиферативной активности. Экспрессии маркеров Л-МСК была выражена слабо в обоих случаях (CD 90, CD 105).

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Импрессионная цитология и иммуноцитохимическое исследование.

Особенности выполнения забора клеток с поверхности роговицы по методике ИЦ: 1) выполнение исследования пациенту проводится лежа с предварительной инстилляцией анестетика; 2) установка векорасширителя; 3) извлечение фильтровального диска в условиях и по правилам процедурного кабинета; 4) прикладывание диска выполняется строго матовой стороной продолжительностью 1-2 мин. и легким нажатием на центральные и периферические части диска. После чего пинцетом, необходимо поддеть диск снизу (со стороны роговицы) и осторожно

удалить его с глазной поверхности; 4) фиксирование образца в 96%-ном растворе этанола и хранение при 4⁰С (до 6 мес). Подробный пошаговый протокол окраски образцов ИЦ описан в главе 4, раздел 4.1., Таблица 11.

Исследование цитокинового профиля в СЖ у пациентов с односторонним СЛН на различных сроках

При выполнении данной работы, пациенты (n=24) были разделены на две группы исходя из типа СЛН:

первая группа состояла из пациентов с **полным** односторонним СЛН (n=15);

вторая группа включала пациентов с **неполным** односторонним СЛН (n=9).

Анализ концентрации цитокинов проводили до и после операции на сроках: 3, 6 и 12 месяцев. Количественную оценку содержания ИЛ 1b; ИЛ-2; ИЛ-4; ИЛ-8; ИЛ-10; TNF- α ; TGF- β в образцах слез, проводили методом ИФА по стандартному протоколу соответствующего производителя.

Результаты иммуноцитохимического исследования с окрашиванием по методике импрессионной цитологии

При отработке протокола окраски образцов ИЦ было выявлено что К19 может иметь ложноположительную окраску и имеет свойства продуцировать фоновое свечение вокруг конгломератов клеток, что может ввести в заблуждение при анализе снимков. В свою очередь, применение окраски на К7 (клон OV-TL 12/30) показало его качественную экспрессию в образцах от пациентов с СЛН и полное отсутствие фонового свечения. Окраска на К12 всегда позволяла идентифицировать роговичный эпителий в образцах, а ядерный маркер бис-бензимида – наличие клеток. В клинической группе из 26 пациентов с сомнительной биомикроскопической картиной для подтверждения диагноза СЛН были окрашены образцы от 11 пациентов. Из них у двух пациентов результаты ИЦ не позволили подтвердить диагноз СЛН по причине отсутствия экспрессии конъюнктивального К7 и были исключены из исследования.

Результаты исследования цитокинового профиля в слезной жидкости у пациентов с односторонним СЛН на различных сроках

По результатам ИФА выявлено, что в 1 и 2 группах цитокины: ИЛ-4 и ИЛ-8 могут проявлять себя как иммунные модуляторы в процессе воспалительных реакций, по крайней мере до 3-6 месяцев, после чего могут проявляться их противовоспалительные свойства. TGF- β на всех этапах исследования в послеоперационном периоде по своей активности соответствовал клиническими симптомам истинного приживления лимбальных аутотрансплантатов. Подъем изучаемых ИЛ и ростовых факторов на сроке в 3 месяца может быть обусловлен непосредственно объемом операционного вмешательства, дальнейшее снижение концентраций в обеих группах патогенетический обусловлено инвазивным характером операции. При сопоставлении цитокинового профиля СЖ с этиологическим фактором СЛН было выявлено, что при постожоговом СЛН кислотного и щелочного генеза концентрация изучаемых интерлейкинов была на порядок выше в дооперационном и послеоперационном периоде с последующим снижением к 6-му месяцу наблюдения. Полученные данные позволяют сказать, что СЛН, развившийся в результате ожога кислотой или щелочью, имеет неблагоприятный прогноз в лечении. Анализ клинической картины и послеоперационного результата был сопоставим с полученными результатами.

КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ОДНОСТОРОННИМ СЛН

Методы хирургического лечения

В зависимости от остаточной толщины роговицы после удаления фиброваскулярного паннуса, наличия или отсутствия глубоких помутнений, васкуляризации (поверхностной/глубокой) роговицы проводили следующие виды хирургического вмешательства (таблица 1), общими этапами для всех явились:

На глазу-реципиенте (пораженном): обработка операционного поля стандартным методом; перитомия конъюнктивы 360° на 5-10 мм за пределы лимба, с фиксацией

узловым швами к склере (викрил 8-0); полное иссечение фибро-вазкулярной ткани роговицы (при неполном СЛН оставляя интактным участок неизменённого эпителия); в ряде случаев (n=17) пациентам выполнялось предварительное выравнивание поверхности роговицы при помощи алмазного 0,5 мм микробора (патент РФ №2752547); формирование 8-10 роговичных туннелей по периферии роговицы на глубину 150-300 мкм, протяженностью 2,5 - 3,0 мм; имплантация ауто-трансплантатов по одному фрагменту в туннель. В качестве защитного покрытия пришивали криоконсервированную чАМ и накладывали МКЛ или только МКЛ на 14 дней.

На глазу-доноре (здоровом): иссечение прямоугольного фрагмента лимба на 12 часах размерами 1,5-2,0 мм шириной и 2,5-3,0 мм длиной, глубиной 250-350 мкм, с разделением его на 8-10 равных фрагментов; наложение двух узловых конъюнктивально-роговичных швов на место биопсии (викрил 8-0).

Таблица 1 – Распределение пациентов в зависимости от типа хирургического вмешательства.

Бесклеевая лимбальная эпителиальная трансплантация (G-SLET) (с англ. <i>Glueless simple limbal epithelial transplantation</i>) G-SLET + чАМ + МКЛ (n=7)		
Модификации G-SLET		
G-SLET с выравниванием роговицы с помощью офтальмологического микробора + чАМ / МКЛ n=4	Фемтолазер-ассистированная FS G-SLET (с англ. <i>Femtosecond laser assisted</i>) + микробор + МКЛ n=8	Передняя послойная кератопластика (ППК) ALK + G-SLET (с англ. <i>anterior lamellar keratoplasty</i>) + микробор + МКЛ n=5

В послеоперационном периоде пациентам назначали инстилляцию капель - в течение первых двух недель в оба Sol. Levofloxacinі 0,005% 3 раза в день, Sol. Dexamethasoni или Sol. Fluorometholoni 0,1% по убывающей схеме в течение 6 месяцев в глаз с СЛН, препараты искусственной слезы в оба глаза 5-6 раз в день, постоянно.

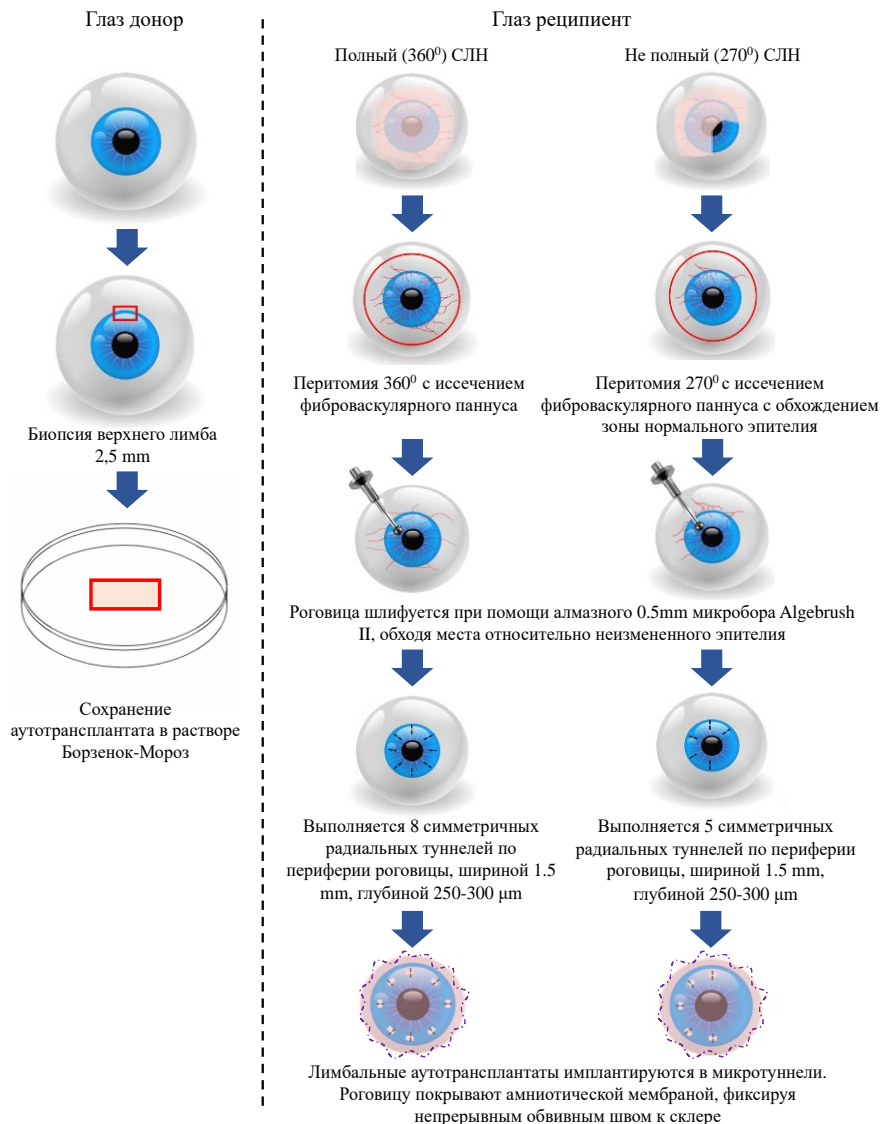


Рисунок 1 – Схема выполнения бесклеевой лимбальной эпителиальной трансплантации с предварительным выравниванием глазной поверхности и биологическим покрытием роговицы при полном и неполном СЛН в мануальной технике.

Преимущества технологии G-SLET: 1) отсутствие реакция отторжения; 2) возможность проведения операции без наркоза (за исключением пациентов детского возраста); 3) быстрый реабилитационный период; 4) возможность использования как мануальной техники формирования туннелей, так и низкоэнергетического ФСЛ, значительно упрощающего операцию и снижающего

операционные осложнения; 5) возможность повторения операции, при отсутствии первоначального эффекта; 6) отсутствие риска для здорового глаза.

Техника восстановления эпителиального слоя роговицы с применением низкоэнергетического ФСЛ.

При данной технологии на глазу-реципиенте после проведения общих этапов 1-4, производят аппланацию с ФСЛ (диаметр от 8,5 до 10,0 мм), затем выполняют сканирование роговицы, встроенной в лазер ОКТ. Ориентация туннелей от 0-90 градусов. Длина туннеля, как и длина разреза, составляют 1,0 мм, его ширина 0,5 мм, общее количество туннелей 8-10, глубина 150-300 мкм. После проведения резекции с глаза-донора осуществляют забор лимбального аутотрансплантата с последующим фрагментированием и имплантируют по одному фрагменту лимба в туннель на глазу-реципиенте (патентом РФ № 2769068).

Преимущества использования ФСЛ: 1) возможность более 60 вариантов траекторий, что позволяет создавать кастомизированные туннели по необходимым для пациента параметрам; 2) подходит пациентам с истонченными роговицами; 3) контроль встроенной в ФСЛ ОКТ; 4) возможность учета циклоторсии.

Техника ППК с трансплантацией фрагментов лимба с фемтосопровождением/мануальной техникой при СЛН у пациентов с истонченной роговицей.

На глазу-реципиенте после проведения общих подготовительных этапов производят аппланацию с ФСЛ, диаметром от 8,5 до 10 мм, глубиной ламеллярного реза от 100 до 300 мкм. После проведения лазерной резекции производят отслоение глубоких слоев роговицы от поверхностных. В подготовленное операционное ложе укладывают донорскую роговицу, предварительно выкроенную лазером (глубина ламеллярного реза - от 100 до 300 мкм) или мануально по при помощи одноразового вакуумного трепана фирмы Morgia (Франция) с дозированной глубиной реза. При этом трепанация производится на 2/3 глубины с контролем, встроенного в микроскоп интраоперационного ОКТ. Трансплантат фиксируют узловыми швами.

На глазу-доноре после забора лимбального фрагмента и его разделения на кусочки производят имплантацию аутотрансплантатов по одному фрагменту в интерфейс между роговицей реципиента и донорским трансплантатом, в местах свободных от швов (патент РФ № 2766166). При этом также возможно формировать туннели как на периферии собственной роговицы, так и на донорском трансплантате при помощи ФСЛ (патент РФ № 2773134).

Преимущества технологии одномоментной ALK+G-SLET: 1) быстрая эпителизация благодаря тому, что рост эпителия происходит по БМ донорской роговицы; 2) высокий функциональный результат, что в ряде случаев исключает необходимость проведения второго этапа (СКП); 3) отсутствие выбраковки ценного донорского материала, так как для проведения ALK необязательно использование донорского материала с высокими показателями плотности эндотелиальных клеток; 4) возможность проведения этапов операции как мануально, так и с использованием ФСЛ; 5) возможность фиксации лимбальных аутотрансплантатов в интерфейс роговицы донор-реципиент.

Клинико-функциональные результаты пациентов в послеоперационном периоде

Выявлено, что к 6 месяцу наблюдения вероятность благоприятного исхода, проведенного хирургического лечения составила 58,3 %. К 12 месяцу вероятность в исследуемой группе значительно повысилась и составила 75%, что полностью соответствовало первичному критерию эффективности. Сроки зрительной реабилитации к году после операции значительно возросли и составили 0,18 (0,03; 0,6) по сравнению с дооперационными данными. Анализ оценки состояния роговицы каждого показателя в отдельности (конъюнктивализация, неоваскуляризация, окрашивание и помутнение) тремя независимыми экспертами продемонстрировал успех хирургического лечения в отличие от исходных данных, что полностью соответствовало вторичному критерию высокой эффективности.

Таблица 2 – Клинико-морфофункциональные показатели лечения пациентов.

Параметр	Период наблюдения	Me	Q1	Q3	Min	Max	p-value*
МКОЗ	До	0,01	0,01	0,04	0,00	0,30	
	6 мес	0,10	0,03	0,35	0,00	0,90	<0,000
	12 мес	0,18	0,03	0,60	0,00	0,90	<0,000
Эпителизация, %	До	0,00	0,00	23,50	0,00	75,00	
	6 мес	100,00	47,50	100,00	0,00	100,00	<0,000
	12 мес	100,00	91,50	100,00	0,00	100,00	<0,000
Конъюнктивализация, баллы	До	2,66	2,33	3,00	1,00	3,00	
	6 мес	0,47	0,00	1,15	0,00	2,60	<0,000
	12 мес	0,33	0,00	1,00	0,00	2,66	<0,000
Неоваскуляризация, баллы	До	2,66	2,32	3,00	1,00	3,00	
	6 мес	1,00	0,33	1,33	0,00	3,00	<0,000
	12 мес	1,15	0,33	2,00	0,00	3,00	<0,000
Окрашивание, баллы	До	2,17	2,00	2,66	1,00	3,00	
	6 мес	0,60	0,00	1,47	0,00	2,00	<0,000
	12 мес	0,60	0,00	1,00	0,00	3,00	<0,000
Помутнение, баллы	До	2,15	1,33	2,80	1,00	3,00	
	6 мес	1,00	0,33	1,60	0,00	3,00	<0,000
	12 мес	1,00	0,33	1,60	0,00	3,00	<0,000

В диссертационной работе (в главе V, раздел 5.4) представлен пошаговый алгоритм ведения пациентов с СЛН на поликлиническом этапе, который включают в себя подробное выяснение специфических жалоб и анамнеза, особенностей биомикроскопии роговицы и окрашивания роговицы нмФЛ, а также алгоритм дополнительной диагностики с проведением ОКТ переднего отрезка глазного яблока и ОКТ в режиме Ангио, ЛСКМ и собственно ИЦ с ИЦХ исследованием по результатам которых можно поставить диагноз и провести соответствующее хирургическое лечение (рисунки 49-50).

ВЫВОДЫ

1. Моделирование процессов ре-эпителизации от лимбальных трансплантатов по поверхности стромы и Боуеновой мембраны (24 дня культивирования) по данным гистологического исследования показало рост клеток вне зависимости от слоя роговицы, это в свою очередь подтвердилось данными сканирующей электронной микроскопии и иммуногистохимического исследования (положительные эпителиальные маркеры K12, K19), при этом на роговице с «БМ-» наблюдалась слабая экспрессия маркера p63, что говорит о сохраненной пролиферативной активности клеток. Контрольное культивирование лимбальных трансплантатов (21 день) в различных средах EpiLife и DMEM/F12, продемонстрировало что фенотипический клетки не отличались и культуры имели смешанный характер. В них присутствовали как эпителиальные клетки ("бульжная мостовая"), так и вытянутые (фибробласто-/МСК-подобные). Иммуноцитохимический анализ клеток показал преимущественный рост и пролиферацию незрелых лимбальных эпителиальных стволовых клеток (маркеры Ki 67, ABCG2) с продукцией маркеров межклеточных контактов (маркеры Connexin 43, ZO-1), с отсутствием роста мезенхимальных стволовых клеток (отрицательные маркеры - CD105 и CD 90), при этом имеется тенденция преобладания экспрессии виментина в клетках, культивированных в среде DMEM/F12.

2. Результаты анализа цитокинового профиля слезной жидкости у пациентов с постожоговым синдромом лимбальной недостаточности на разных сроках наблюдения после проведенного лечения, доказали, что у пациентов после ожога кислотой концентрация изучаемых провоспалительных интерлейкинов была на порядок выше в дооперационном периоде и в течение 3-х месяцев после операции с последующим снижением к 6-му месяцу наблюдения и стабильно низким уровнем в последующем периоде. При ожоге щелочью уровень провоспалительных цитокинов к 6-му

месяцу наблюдения – возрастал, а в последующем крайне незначительно снижался.

3. Импрессионная цитология является прижизненным, повторяемым и достоверным методом диагностики синдрома лимбальной недостаточности. С помощью иммуно-цитохимического анализа мазков-отпечатков с поверхности роговицы, были выявлены наиболее специфичные внутриклеточные маркеры характерные для эпителия конъюнктивы – кератин 7 и роговицы – кератин 12. Их наличие на поверхности роговицы подтверждает или опровергает диагноз синдрома лимбальной недостаточности.

4. Разработанная технология аутологичной бесклеевой лимбальной эпителиальной трансплантации (G-SLET) с предложенными модификациями: применение микробора для выравнивания передней поверхности роговицы, использование фемтосекундного лазера для формирования роговичных туннелей, одномоментная передняя послойная кератопластика в сочетании с G-SLET, является эффективной и способствует успешной ре-эпителизации роговицы, так как процент эпителизации роговицы у пациентов по данным компьютерного анализа изображений к 6 месяцам после операции составил 58,3%, а через год - 75%, медиана максимально скорректированной остроты зрения до операции от 0,01 (0,01;0,04) статистически значимо повысилась до 0,18 (0,03; 0,6) к 12 месяцам послеоперационного наблюдения ($p < 0,001$).

5. По данным независимой экспертной оценки, в результате выполнения G-SLET, основные показатели характеризующие успех хирургического лечения от исходных, до достигнутых через 6 и 12 мес. после операции соответственно составили: конъюнктивализация роговицы снизилась от 2,66 балла до 0,47 и 0,33 баллов; неоваскуляризация роговицы от исходных 2,66 уменьшилась до 1,0 и 1,15 баллов; окрашивание роговичного эпителия от 2,17 балла достигла 0,6 и 0,6 соответственно. Степени помутнения роговицы до операции и в послеоперационном периоде были сопоставимы (при

использовании GSLET без послойной кератопластики), что также соответствует вторичному критерию высокой эффективности.

6. Разработанный пошаговый алгоритм ведения пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности, позволяет определить необходимый и достаточный в каждом конкретном клиническом случае набор диагностических исследований, поставить и верифицировать клинический диагноз заболевания и выбрать оптимальную тактику хирургического лечения, что приводит к высокому анатомическому и функциональному результату.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с СЛН, осложненным наличием симблефарона век, деформаций сводов, лагофтальма, трихиаза необходимо первым этапом хирургического лечения проведение окулопластического вмешательства, после которого возможно проведение реконструкции эпителия по технологии G-SLET.

2. Выполнение технологии G-SLET наиболее эффективно в лечении пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности, при этом рекомендованный промежуток проведения реконструкции составляет не менее года после травмы, стойкой ремиссии кератита и любого другого постинфекционного процесса.

3. Предложенная оптимизированная методика импрессионной цитологии с иммуноцитохимическим исследованием и окрашиванием на выявленные специфические маркеры (для эпителия роговицы кератин 12 и конъюнктивы кератин 7), может быть использована в качестве дополнительной диагностики синдрома лимбальной недостаточности в затруднительных случаях, и в качестве норматива для дальнейших клинико-экспериментальных исследований, проводимых в рамках диагностики пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности.

4. Пациентам с истонченными роговицами рекомендовано проведение одномоментной передней послойной кератопластики с пересадкой фрагментов лимба со здорового глаза с помощью мануальной технологии или с использованием фемтосекундного лазера.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., **Калиникова С.Ю.**, Герасимов М.Ю. Диагностика синдрома лимбальной недостаточности. Обзор литературы // Офтальмохирургия. 2022;3: 82–97.

2. Малюгин Б.Э., **Калиникова С.Ю.**, Исабеков Р.С., Антонова О.П., Фомин А.В. Возможности оптической когерентной томографии переднего отрезка в режиме ангио (AS-OCTA) в диагностике и тактике хирургического лечения заболеваний роговицы // Офтальмохирургия. –Офтальмохирургия. – 2023. - №2. – С. 62-69.

3. Малюгин Б.Э., Исабеков Р.С., **Калиникова С.Ю.**, Антонова О.П. Методы диагностики и лечения неоваскуляризации роговицы» // Вестник офтальмологии. – 2023. - №4.

4. Malyugin, B.; **Kalinnikova, S.**; Isabekov, R.; Ostrovskiy, D.; Knyazer, B.; Gerasimov, M. Diagnostic Algorithm for Surgical Management of Limbal Stem Cell Deficiency. *Diagnostics* 2023, 13, 199. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13020199>

5. Malyugin, B.; **Kalinnikova, S.**; Knyazer, B.; Gerasimov, M. Midterm outcomes of autologous glueless simple limbal epithelial transplantation for unilateral limbal stem cell deficiency. – *Cornea*. - 2023. №4. – doi: 10.1097/ICO.0000000000003279.

Патенты РФ на изобретение по теме диссертации

1. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., **Калиникова С.Ю.**, Герасимов М.Ю. Патент РФ № 2766166 «Способ реконструкции эпителиального слоя роговицы

при синдроме лимбальной недостаточности у пациентов с истонченной роговицей», дата публикации 08.02.2022.

2. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., **Калиникова С.Ю.**, Герасимов М.Ю., Мюллер Ф., Бернау В. Патент RU № 2773134 «Способ реконструкции эпителия роговицы при синдроме лимбальной недостаточности одномоментной фемтолазер-ассистированной передней послойной кератопластики и трансплантации фрагментов лимба», дата публикации 30.05.2022.

3. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., **Калиникова С.Ю.**, Герасимов М.Ю., Бернау В., Мюллер Ф. Патент RU № 2769068 «Способ восстановления эпителиального слоя роговицы при одностороннем синдроме лимбальной недостаточности с применением низкоэнергетического фемтосекундного лазера», дата публикации 28.03.2022.

4. Малюгин Б.Э., **Калиникова С.Ю.**, Герасимов М.Ю., Дибина Д.А., Ткаченко И.С. Патент RU 2752547 «Способ выравнивания поверхности роговицы микробором при хирургическом лечении синдрома лимбальной недостаточности и/или наличия кальцификатов роговицы (варианты)», дата публикации 29.07.2021.

5. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., **Калиникова С.Ю.**, Герасимов М.Ю., Исабеков Р.С. Патент RU 2796951 «Способ реконструкции эпителиального слоя роговицы у пациентов с двусторонним синдромом лимбальной недостаточности», дата публикации 29.05.2023.

6. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., **Калиникова С.Ю.**, Исабеков Р.С. Заявка на патент РФ №2023110236 «Способ реконструкции эпителиального слоя роговицы у пациента с двухсторонним синдромом лимбальной недостаточности с использованием низкоэнергетического фемтосекундного лазера»,

7. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Нефедова О.Н., Мюллер Ф., Герасимов М.Ю., **Калиникова С.Ю.** Заявка на патент РФ №2022130858 «Способ реконструкции эпителиального слоя роговицы при одностороннем синдроме лимбальной недостаточности путем получения лимбальных стволовых клеток

при помощи низкоэнергетического высокочастотного фемтосекундного лазера LDV Z8», заявка от 28.11.2022.

8. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Мушкова И.А., Хубенцова М.Х., **Калинникова С.Ю.**, Образцова М.Р. Заявка на патент РФ № 2023113730 «Способ забора мазка-отпечатка с конъюнктивы и роговицы для верификации диагноза синдром сухого глаза и синдрома лимбальной недостаточности. Варианты», заявка от 26.05.2023.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СЛН – синдром лимбальной недостаточности

ИГХ – иммуногистохимия

ИЦХ – иммуноцитохимия

ИЦ – импрессионная цитология

ФСЛ – фемтосекундный лазер

нмФЛ – низкомолекулярный флюоресцеин

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ЛЭСК – лимбальные эпителиальные стволовые клетки

МКОЗ – максимально скорректированная острота зрения

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

Л-МСК – лимбальные мезенхимальные стволовые клетки

СКП – сквозная кератопластика

ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

БК – бокаловидный клетки

К – кератины

ОКТ – оптическая когерентная томография

Биографические данные

Калинникова Светлана Юрьевна родилась 24 октября 1995 года в городе Москва. В 2019 году окончила Московский Государственный Медико-Стоматологический Университет им. А.И. Евдокимова по специальности «Лечебное дело». В 2019-2021 годах проходила ординатуру по специальности «Офтальмология» на базе ФГАУ «НМИЦ «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. С 2021 по 2023 год проходила аспирантуру по направлению «Глазные болезни» на базе отдела трансплантационной и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока Головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Является автором 13 печатных работ, из них 10 – рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования и РФ, 3 – в зарубежной печати. Автор 13 патентов РФ на изобретение. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, из них 3 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, и 2 статьи в журналах, входящих в международную базу данных «Scopus», получены 6 патентов Российской Федерации на изобретение. Трехкратный победитель (1-е место) на конференции молодых ученых в рамках всероссийской научной-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (2021-2023 гг.).