

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-
ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС «МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ
АКАДЕМИКА С.Н. ФЕДОРОВА» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Малюгин Борис Эдуардович

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Борзенко Сергей Анатольевич

доктор медицинских наук

МОСКВА – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Нормальное строение и функции эпителиального слоя роговицы и лимба	12
1.2. Особенности регенерации эпителиального слоя роговицы	16
1.3. Современные представления об этиологии и патогенезе одностороннего синдрома лимбальной недостаточности.....	17
1.4. Методы диагностики и хирургического лечения одностороннего синдрома лимбальной недостаточности	18
1.5. Заключение по обзору литературы	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	44
<i>2.1. Материалы и методы экспериментальной части исследований.....</i>	<i>44</i>
2.1.1. Определение иммунофенотипа клеток из культивированных лимбальных трансплантатов. Часть 1.....	44
2.1.2. Экспериментальное моделирование и изучение процессов ре-эпителизации лимбальных эпителиальных стволовых клеток в эксперименте ex vivo. Часть 2.	51
<i>2.2. Материалы и методы клинической части исследования.....</i>	<i>58</i>
2.2.1. Общая характеристика клинической группы	58
2.2.2. Клинико-функциональные показатели пациентов в предоперационном периоде.....	64
2.2.3. Методы клинико-функциональных исследований.....	66
2.2.4. Статистическая обработка данных	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	70
3.1. Результаты экспериментального определения иммунофенотипа клеток из культивированных лимбальных трансплантатов. Часть 1.....	70

3.2. Результаты ex vivo экспериментального моделирования аутотрансплантации фрагментов лимба с парного донорского глаза по различным поверхностям роговицы. Часть 2.	84
ГЛАВА 4. ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	93
4.1. Импрессионная цитология и иммуноцитохимическое исследование	93
4.2. Исследование цитокинового профиля в СЖ у пациентов с односторонним СЛН на различных сроках	98
4.3. Результаты иммуноцитохимического исследования с окрашиванием по методике импрессионной цитологии.....	99
4.4. Результаты исследования цитокинового профиля в слезной жидкости у пациентов с односторонним СЛН на различных сроках	110
ГЛАВА 5. КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ОДНОСТОРОННИМ СЛН.	122
5.1. Методы хирургического лечения.....	122
5.2. Клинико-функциональные результаты пациентов в послеоперационном периоде.....	130
5.3. Статистическая обработка данных.	142
5.4. Алгоритм диагностики и хирургического лечения пациентов с односторонним СЛН	142
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	151
ВЫВОДЫ	166
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	169
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	170
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	171

ВВЕДЕНИЕ

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 (Puangsricharern 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 осведомлённость 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). А также предлагаются технологии трансплантации аутологичных культивированных клеток эпителия роговицы (Rama P., 2010; Zakaria N., 2014).

Таким образом, предложенные технологии либо являются высоко травматичными, либо малоэффективными, а использование клеточных технологий культивирования и фибринового клея запрещены 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 аутотрансплантации 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 аутотрансплантации 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 преимущественно 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 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 аутотрансплантацией 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.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Степень достоверности результатов проведенных исследований определяется количеством наблюдений, использованием адекватных методов исследования и подтверждается в процессе анализа материала. 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. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, строго аргументированы и логически вытекают из 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: № 2752547 от 14.03.2021; № 2766166 от 26.07.2021; № 2773134 от 25.04.2022; № 2769068 от 28.03.2022; №2796951 от 04.04.2023; 3 заявки на патент РФ №2023110236 от 21.04.2023; №2022130858 от 28.11.2022; № 2023113730 от 26.05.2023.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора состоит в ведении пациентов, а именно проведении до- и послеоперационной диагностики, ассистировании и непосредственном участии на операциях. Соискателем самостоятельно был проведен забор слезной жидкости и мазков - отпечатков с роговицы, принято активное участие в экспериментальных исследованиях *ex vivo*, проведение окрашивания для иммуноцито- и гистохимического исследования, выполнение иммуноферментного анализа и проточной цитофлуориметрии. Автором освоены методики, применяемые для получения и оценки результатов, выполнен анализ и описание результатов, полученных в ходе исследования, сформулированы выводы, практические рекомендации и основные положения, выносимые на защиту.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Нормальное строение и функции эпителиального слоя роговицы и лимба

Строение эпителия роговицы человека

В норме эпителиальный слой роговицы составляет около 10% (~50 мкм) от всей толщины роговицы [19,70,130]. Он образован многослойным плоским неороговевающим эпителием, состоящим из 5-7 слоев клеток (поверхностные, крыловидные, базальные), лежащих на базальной мембране (*lamina lucida* и *lamina densa*). Поверхностные клетки представляют собой 2-3 слоя плоских по форме клеток, их ядра располагаются параллельно поверхности за счет чего обеспечивается гладкость роговицы. Данные клетки секретируют гликокаликс, и содержат микроворсинки на своей поверхности, которые обеспечивают стабильность прекорнеальной слезной пленки (ее внутреннего муцинового слоя). Крыловидные клетки представляют собой также 2-3 слоя многоотростчатых клеток, которые создают прочные контакты между поверхностными и базальными клетками. Базальные клетки представляют собой призматические клетки с крупными ядрами, которые закреплены на базальной мембране посредством хемидесмосом и филаментов [18, 93]. Данный слой клеток называют также герминативным, благодаря способности клеток к митозу. Базальная мембрана является продуктом секреции базальных клеток и состоит из коллагена IV типа и ламинина. Основная функция базальной мембраны заключается в адгезии эпителия роговицы к строме. Эпителий роговицы получает иннервацию из конъюнктивы и стромальных нервов. Жизненный цикл эпителиальных клеток составляет 7-10 дней, затем клетки слущиваются при моргающих движениях век.

Функции эпителиального слоя роговицы: 1) барьерная и защитная (иммунная); 2) обеспечение прозрачности роговицы; 3) стабилизация прекорнеальной слезной пленки; 4) избирательная проницаемость, обеспечивающая гомеостаз роговицы.

Строение лимба роговицы человека

Лимб роговицы является местом перехода роговицы в склеру, имеющим вид полупрозрачного кольца, шириной 1,5 - 2,5 мм (рисунок 1).

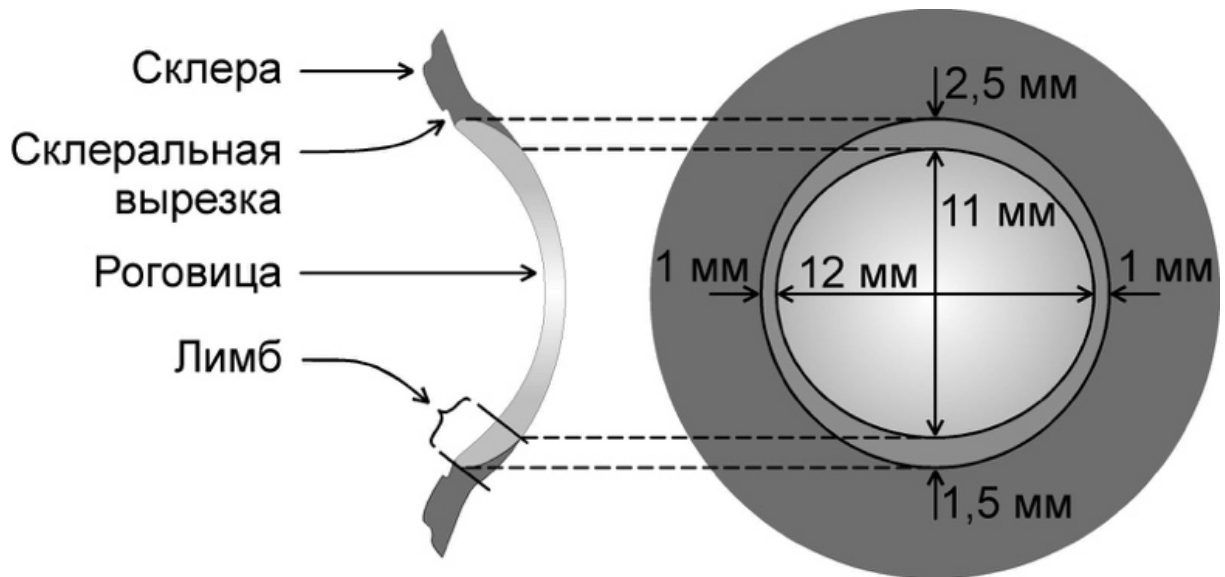


Рисунок 1 – Схематическое строение лимба роговицы человека

В хирургическом лимбе выделяют переднюю голубоватую зону, располагающуюся между границей Боуеновой мембраны (БМ) и кольцом Швальбе, которое является окончанием Десцеметовой мембраны (ДМ). Задняя белая зона лежит поверх трабекулярной сети между кольцом Швальбе и склеральной шпорой [2].

Гистологически граница лимба проходит косо, по линии соединения окончаний БМ и ДМ (рисунок 2). Наружная бороздка менее заметна, так как наружная поверхность склеры покрыта конъюнктивой, где эпителий лимба резко утолщается за счёт увеличения его слоёв. У переднего края лимба БМ исчезает, нижняя граница эпителия становится волнистой. Подэпителиальный слой теряет характер роговичной ткани с закономерным расположением её пластинок. Под эпителием появляется нежная соединительная ткань – конъюнктивит с её краевой петливой сосудисто-нервной сетью, образованной за счёт концевых ветвей конъюнктивальных, передних цилиарных и эписклеральных сосудов - перилимбальное сплетение. Иннервация лимба, в

свою очередь, обеспечивается ветвями коротких и длинных цилиарных нервов, образующих нервное сплетение [1, 23].

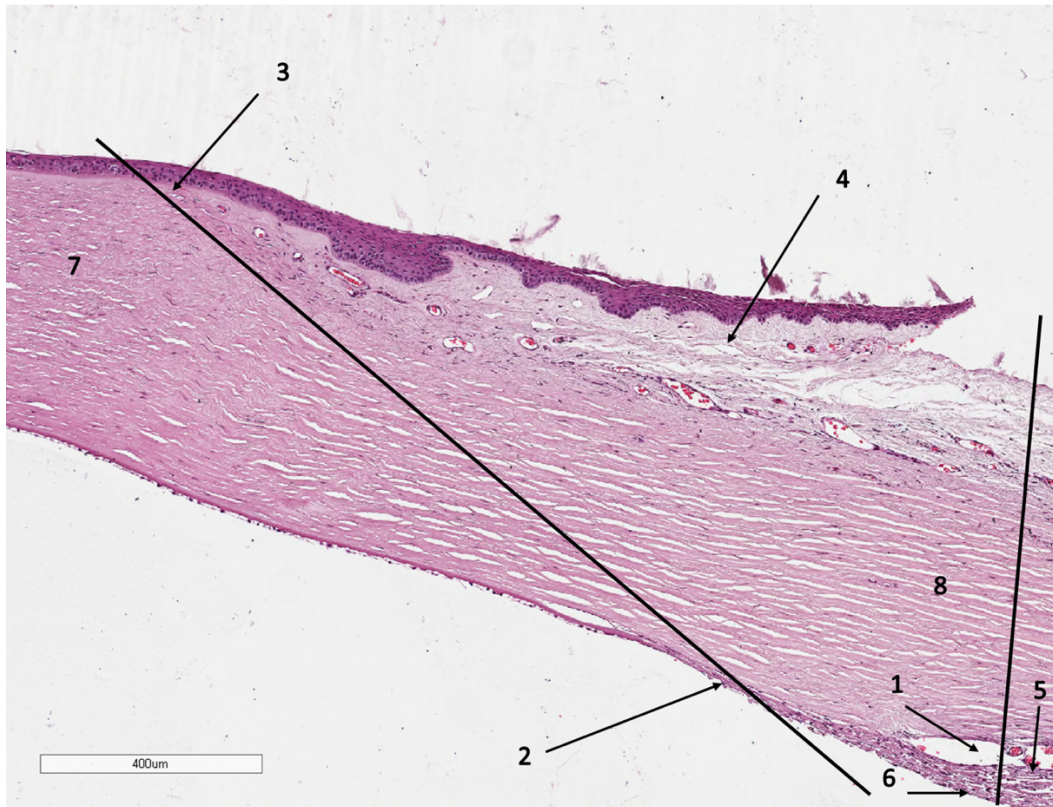


Рисунок 2 – Гистологический препарат лимба роговицы человека. Окраска гематоксилин-эозин, ув. x400 (предоставлено к.м.н. Шацких А.В.). 1 – Шлемов канал; 2 – окончание Десцеметовой мембраны; 3 – окончание Боуменовой Мембраны; 4 – конъюнктивa; 5 – склеральная шпора; 6 – Трабекулярная сеть; 7 – роговица; 8 – склера.

Классическая архитектура лимба при биомикроскопическом исследовании имеет вид волнистых пигментированных гребней, более заметных на 12 и 6 часах, так называемых палисад Вогта [107]. Данные структуры образуют лимбальные ниши, в базальном слое которых располагаются ЛЭСК, представляющие собой дифференцированные унипотентные стволовые клетки (СК). Лимбальные ниши обладают уникальными физическими, аутокринными и паракринными свойствами, важными для поддержания нормального гомеостаза клеток [27, 89]. Так известно, что, микроокружение ЛЭСК богато уникальными кластерами CD90

и CD105 позитивных мезенхимальных стволовых клеток (МСК). ЛЭСК находятся в тесном контакте с поддерживающими клетками, включая меланоциты, кератоциты, клетки Лангерганса секретирующих факторы, которые поддерживают клональную пролиферацию ЛЭСК [146].

Внеклеточный матрикс лимбальной ниши богат гликопротеидами и такими белками как: витронектин, фибронектин, $\alpha 2$ и $\beta 2$ -ламинином, тенасцином С, $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5$ и $\alpha 6$ коллаген IV типа и лигандами Wnt, не менее важными для поддержания и функционирования ЛЭСК [37, 80, 43]. ЛЭСК за счет ассиметричного деления генерируют клетки-предшественники, или ТАК, которые делятся на ПМК и мигрируют центрипетально и к поверхности, где ПМК дифференцируются уже в ТДК [52] (рисунок 3).

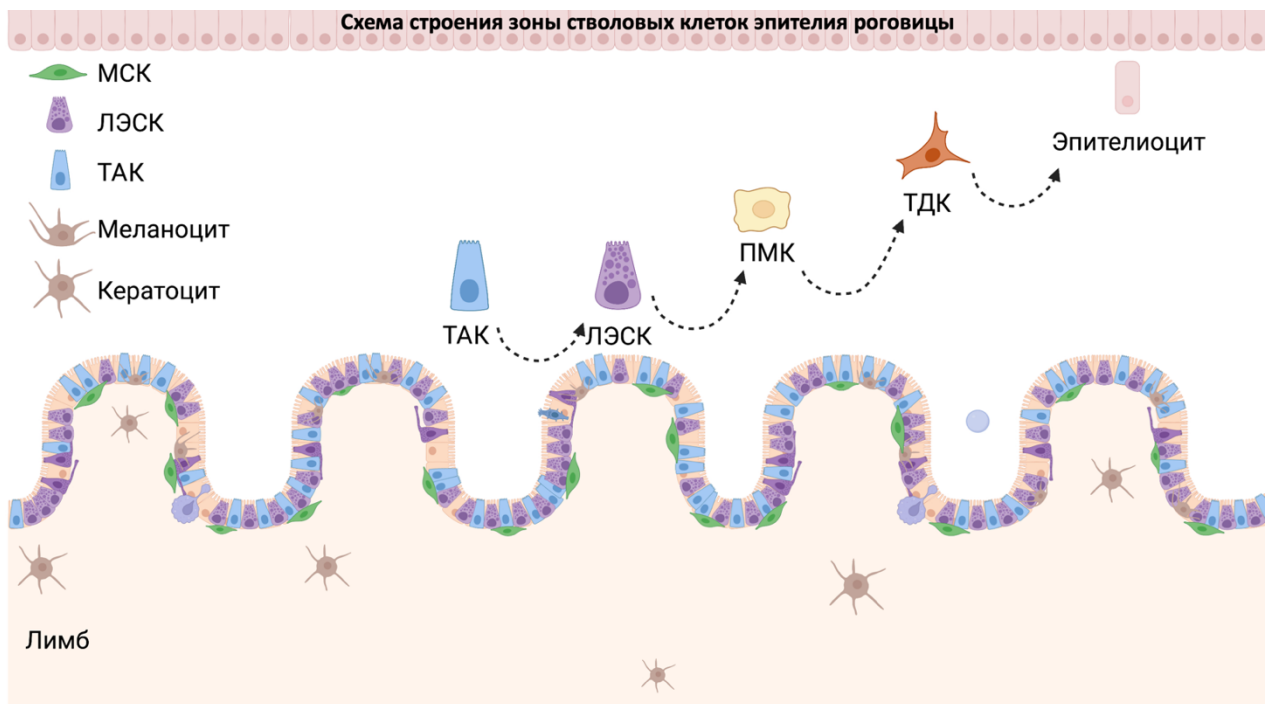


Рисунок 3 – Схема строения зоны стволовых клеток эпителия роговицы. ТАК – транзитные амплифицирующие клетки; ПМК – постмитотические клетки; ТДК – терминально-дифференцированные эпителиальные клетки; МСК – мезенхимально-стволовые клетки; ЛЭСК – лимбальные эпителиальные стволовые клетки;

Исходя из вышесказанного основная функция лимба – защитная, она осуществляется путем постоянного поддержания и обновления эпителия роговицы как во время нормального гомеостаза, так и в ответ на повреждение путем замещения дефектов дифференцированными эпителиальными клетками.

1.2. Особенности регенерации эпителиального слоя роговицы

Особенности регенерации эпителиального слоя роговицы связаны со способностью ЛЭСК к пролиферации и движению в результате чего происходит закрытие поверхностных дефектов роговицы. Так, согласно гипотезе XYZ, предложенной R. Thoft и J. Friend процесс дифференцировки клеток можно описать следующей формулой $X + Y = Z$, где X – пролиферация базальных эпителиальных клеток, Y – дифференцировка и их центростремительная миграция, и Z – десквамация эпителиальных клеток [151] (рисунок 4).

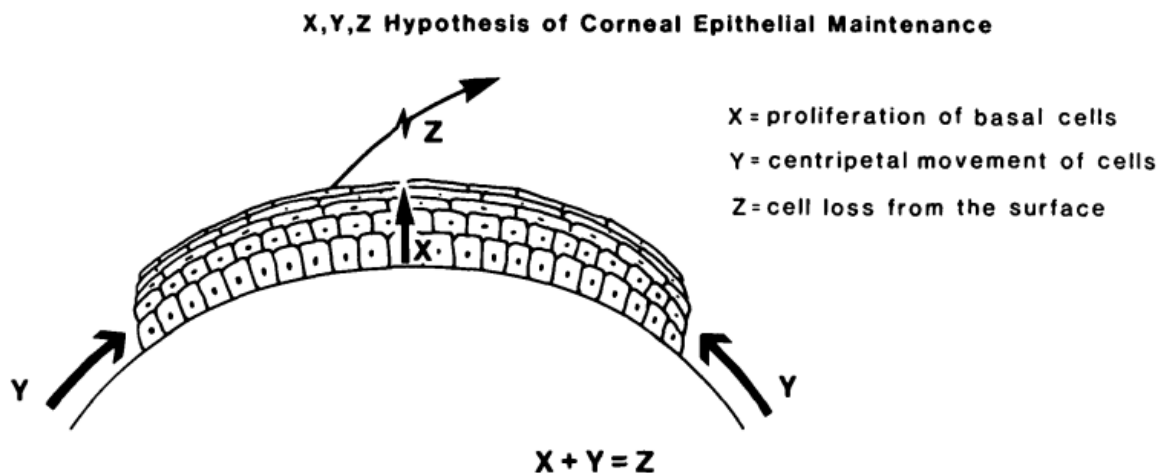


Рисунок 4 – Схематическое изображение гипотезы XYZ (по Thoft R. и Friend J., 1983)

Для центростремительного движения эпителиальных клеток необходимо наличие здоровых ЛЭСК. В нормальных условиях после повреждения эпителиальный слой роговицы подвергается активному процессу восстановления в течение 7-14 дней, при условии интактной

базальной мембраны. При более глубоких дефектах с повреждением базальной мембраны процесс эпителизации может занимать от 1 до 2 месяцев [110, 129]. В таком случае неизбежно происходит фиброзирование с образованием рубцовой ткани и, как следствие, помутнение роговицы [116]. При повреждении эпителия происходит выброс воспалительных цитокинов ИЛ-1, ФНО- α , которые в свою очередь активируют кератоциты, продуцирующие факторы роста (EGF, HGF, KGF, IGF, T-B4) и цитокины (ИЛ-6, ИЛ-8), вызывающие усиление пролиферации и миграции эпителиальных клеток [65, 110, 115, 139, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

Ре-эпителизация роговицы — это сложный многоэтапный процесс, включающий в себя активацию ЛЭСК, образование клеток предшественников, дифференцировку, пролиферацию, их миграцию, адгезию и дифференцировку при участии воспалительных клеток, активирующих факторы роста и цитокины.

1.3. Современные представления об этиологии и патогенезе одностороннего синдрома лимбальной недостаточности

Согласно международному консенсусу относительно синдрома лимбальной недостаточности (Global Consensus on Definition Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency) опубликованному в 2019 году, он определяется как «заболевание глазной поверхности, вызванное уменьшением популяции и/или функции эпителиального слоя роговицы/клеток-предшественников; что приводит к неспособности поддерживать нормальный гомеостаз эпителия роговицы» [71]. Такое нарушение способности стволовых клеток к самообновлению может развиваться вследствие травмы, ожога, аутоиммунных, воспалительных и генетически опосредованных заболеваний [17].

Клинические проявления СЛН связаны с возникновением признаков эпителиальной дисфункции, таких как персистирующие и рецидивирующие дефекты эпителия роговицы, конъюнктивализация, неоваскуляризация, хроническое воспаление глазной поверхности и образование рубцовой ткани.

В связи с полным или частичным отсутствием источника регенерации роговичного эпителия, происходит миграция ткани конъюнктивы и бокаловидных клеток (БК) на поверхность роговицы, что сопровождается образованием фиброваскулярного паннуса и, в тяжелых случаях, тотальным помутнением роговицы [134, 41]. В результате, происходит значительное снижение зрительных функций пораженного глаза, появляется светобоязнь, возникает хронический болевой синдром [141].

Точная диагностика СЛН имеет решающее значение, поскольку соответствующее лечение может предотвратить прогрессирование заболевания и дальнейшее повреждение глазной поверхности. Известно, что проведение сквозной кератопластики (СКП) при СЛН относится к категории «высокого риска» так как происходит рецидив конъюнктивализации и васкуляризация донорского трансплантата по причине отсутствия источника для регенерации нормального роговичного эпителия [22, 44, 79, 106].

Именно поэтому необходима точная диагностика СЛН на дохирургическом этапе. На сегодняшний день описано большое количество методов диагностики СЛН, но далеко немногие из них дают точное представление о фенотипе клеток, покрывающих роговицу, а именно о наличии бокаловидных клеток (БК) и других клеток конъюнктивального происхождения [13], а также об экспрессии специфических кератинов (К) [101] и муцинов [67].

1.4. Методы диагностики и хирургического лечения одностороннего синдрома лимбальной недостаточности

Клиническая картина СЛН. Симптомы и жалобы

У пациентов с СЛН, довольно часто наблюдается широкий спектр симптомов, связанных с плохим заживлением роговицы из-за наличия эпителиальных дефектов и рецидивирующих эрозий. По этой причине они нередко испытывают внезапную глазную боль. Также частыми жалобами являются: хроническое покраснение (гиперемия) конъюнктивы, снижение

остроты зрения, светобоязнь, слезотечение, блефароспазм, ощущение инородного тела [104].

Наряду со слезотечением, еще одной распространенной жалобой является сухость глаз, которая объясняется развитием синдрома сухого глаза (ССГ), степень которого варьирует от средней до тяжелой. Чаще всего ССГ наблюдается при обширной конъюнктивализации и ожогах давностью более одного года. Однако большинство из этих симптомов неспецифичны и их наличия недостаточно для правильной постановки диагноза СЛН.

Биомикроскопия и окрашивание глазной поверхности при осмотре на щелевой лампе

Биомикроскопия при помощи щелевой лампы является «золотым стандартом» осмотра пациентов с подозрением на СЛН. Так, на первой (легкой) стадии визуализируется неровная поверхность роговицы с потерей нормального светового рефлекса, непрозрачность или ступенчатость эпителия, отсутствие палисад Вогта, и/или уплощение лимба в этой области. Непрозрачность эпителия при СЛН обусловлена наличием аномальных метапластических эпителиальных клеток роговицы и конъюнктивы при отсутствии неоваскуляризации [41, 57]. На второй (средней) стадии эпителий значительно истончен, неравномерной толщины, присутствует поверхностная неоваскуляризация, происходит формирование фиброваскулярного паннуса по периферии роговицы. Для третьей (тяжелой) стадии характерны: рубцевание стромы с диффузным или тотальным помутнением вплоть до глубоких слоев роговицы, поверхностная и глубокая неоваскуляризация роговицы и, в ряде случаев, образование стойкого или периодически рецидивирующего эпителиального дефекта [104].

Стадии СЛН классифицируются по степени вовлеченности центральной (5 мм) зоны роговицы. На I стадии поражается только периферия роговицы, имеется нормальный эпителий в пределах 5 мм оптической части роговицы. Её подразделяют на 3 под-стадии по проценту вовлеченности лимбальной

области (более или менее 50%). Для II стадии характерно поражение как периферии, так и центральной зоны роговицы (5 мм). Она подразделяется на 2 под-стадии также по проценту вовлеченности лимбальной области (более или менее 50%). На III стадии поражается вся поверхность роговицы и вовлеченность лимба составляет 100% [71].

Стандартное обследование с помощью щелевой лампы часто не дает полной информации о состоянии эпителиального слоя роговицы. Исходя из этого, оно всегда дополняется окрашиванием низкомолекулярным флюоресцеином и осмотром при освещении кобальтово-синим светом, что позволяет оценить эпителиальный слой более детально. Так как склера рассеивает падающий синий свет и обесцвечивает флюоресцеин, для создания максимального контраста между окрашенными и неокрашенными участками конъюнктивы и роговицы необходимо использование дополнительного желтого «барьерного» фильтра.

Как известно, в норме роговичный эпителий не окрашивается флюоресцеином. Однако при ССГ и эпителиопатиях различной этиологии, при ношении контактных линз, кератитах и некоторых видах дистрофий роговицы может выявляться паттерн в виде точечного окрашивания («punctate staining» - англ.). На ранних стадиях СЛН такой вид окрашивания также может присутствовать, что затрудняет постановку диагноза [38, 45, 63].

При нанесении флюоресцеина на конъюнктиву, краситель в норме скапливается в естественных складках и гребнях конъюнктивы, попадая в межэпителиальные пространства. При этом наблюдается характерное окрашивание в виде бороздок («furrow staining» англ.) [103, 119]. При СЛН аномальный слой конъюнктивального/метапластического эпителия, как правило, тоньше и имеет меньше плотных межклеточных соединений [58]. Поэтому он может окрашиваться в виде завитка или вихря («vortex pattern staining» - англ.). При данном виде окрашивания аномальный эпителий имеет вид распространяющегося спирально от зоны лимба до зрительной оси [104]. При СЛН можно наблюдать окрашивание аномального эпителия по типу

«воронкообразной эпителиопатии», («whorl-like epitheliopathy» - англ.), которая присутствует чаще на средней стадии СЛН [36, 38, 57]. При оценке глазной поверхности нередко используют окрашивание лиссаминовым зеленым для выявления нежизнеспособных эпителиальных клеток. Пораженные области имеют ярко-зеленый цвет [75].

Гистологическое исследование фиброваскулярного паннуса роговицы

Когда в ходе операции иссекается паннус, он может быть направлен на гистологическое исследование для подтверждения, либо опровержения диагноза СЛН. В ходе этого исследования также определяют наличие воспалительных клеток и инфильтратов, новообразованных сосудов, БК, а также состояние эпителия и стромы роговицы.

В работе Fatima и соавт. были исследованы гистологически фиброваскулярные паннусы от 29 пациентов с диагнозом СЛН. Было обнаружено, что в 62% присутствует гиперплазия эпителия, 66% - активный фиброз, 21% - воспаление, 28% - гигантоклеточная реакция и в 14% случаях наличие кальцификатов в строме. Бокаловидные клетки при этом наблюдали лишь в 64%, а их отсутствие авторы объяснили плоскоклеточной метаплазией конъюнктивы вследствие длительной ишемии. Также было обнаружено, что амниотическая мембрана, используемая для реконструкции поверхности глаза, может сохраняться в паннусе роговицы в течение длительного времени (42% случаев), а наиболее тяжелая степень СЛН наблюдается у пациентов, получивших ожог щелочью [121].

Теми же авторами в 2015 году было сделано сообщение о влиянии гистологических особенностей паннуса роговицы после ожога на результат трансплантации культивированного лимбального эпителия (CLET). Ученые обнаружили, что пациенты с гиперплазией эпителия или кальцификатами в иссеченном паннусе демонстрируют неблагоприятный исход трансплантации по сравнению с пациентами без гиперплазии ($p=0,003$) или кальцификатов ($p=0,018$) [49].

Импрессионная цитология

Предоперационным неинвазивным вариантом диагностики, дающим более полную картину наличия или отсутствия специфических кератинов и муцинов, по мнению ряда авторов, является метод импрессионной цитологии (ИЦ) [8, 44].

Впервые он был описан Egbert с соавт. (1977) [64]. Тогда, эта методика была использована как способ получения клеточных мазков-отпечатков конъюнктивы при помощи целлюлозно-ацетатных дисков с последующим окрашиванием гематоксилином и красителем Шиффа (Periodic acid-Schiff – PAS). В результате исследователи описали муцин-продуцирующие БК наряду с эпителиальными [64,84]. Tseng модифицировал методику Egbert, и окрашивал образцы комбинацией PAS и окраски по Папаниколау. На основе изменений плотности БК, морфологических изменений ядра и цитоплазмы им была предложена классификация плоскоклеточной метаплазии эпителия конъюнктивы [84, 152].

Maskin S. (1986) описал специальную технику, с помощью которой эпителиальные клетки конъюнктивы, полученные методом импрессионной цитологии, могут быть изучены при помощи электронной микроскопии [84, 114].

В исследовании Puangsricharern и Tseng (1995) ИЦ была выполнена у 137 пациентов с клиническим диагнозом СЛН. Результаты исследования выявили признаки конъюнктивализации (на основании наличия БК) в 94 (70%) случаях; в остальных 40 (30%) БК не были обнаружены [134]. Исследователи предположили, что отсутствие БК у этой подгруппы пациентов может представлять собой субклиническую стадию СЛН, или может быть связано с нечувствительностью метода ИЦ к ранним стадиям заболевания. Тем не менее, присутствие БК в роговице является признаком конъюнктивализации и, следовательно, подтверждает диагноз СЛН.

Чуть позднее те же исследователи (1997) обнаружили на поверхности, ранее пришитой амниотической мембраны (АМ) фенотип эпителия

конъюнктивы с БК у всех пациентов с СЛН. Был сделан вывод, что отсутствие фенотипа эпителия роговицы на аваскулярной строме подтверждает предположение об отсутствии трансдифференцировки конъюнктивы *in vivo*, и указывает на необходимость дополнительной трансплантации ЛЭСК для эффективной реконструкции поверхности роговицы [132].

Японские ученые Shimazaki J., Yang H., Tsubota K. (1997), также занимались изучением реконструкции роговичного эпителия после трансплантации АМ у пациентов с химическими и термическими ожогами [142]. До операции трем пациентам была проведена ИЦ бульбарной конъюнктивы и роговицы, а также гистологическое исследование фиброваскулярного pannusa. По результатам ИЦ у всех трех пациентов до операции были выявлены БК клетки на поверхности роговицы. Гистологический анализ также показал наличие БК, массивный коллагеноз с умеренной клеточной инфильтрацией. Не смотря на успешные исходы проведенного лечения, незначительная остаточная конъюнктивализация роговицы наблюдалась авторами во всех трех случаях, однако она не затрагивала оптическую зону.

В 2001 году вышла статья о классификации ожогов роговицы (Dua H. и соавт.) в которой указывается на то, что наличие БК действительно подтверждает диагноз СЛН, но их отсутствие не исключает диагноза, особенно в случаях тяжелого течения СЛН, когда повреждена вся поверхность глаза [55].

Отечественными авторами (2016) была предложена усовершенствованная методика ИЦ с проведением морфологического и визуально-количественного анализа, которая позволила разделить пациентов с васкуляризацией и помутнением роговицы на 2 группы по показаниям: подходящих для СКП или для лимбальной трансплантации [13]. В ходе исследования 40 глаз роговичный фенотип был выявлен в 28 (70%), а конъюнктивальный – в 12 (30%). В последующем пациентам было проведено соответствующее оперативное лечение, которое подтвердило правильность

выделения этих групп. У 22 (55%) пациентов 1-й группы и 6 (15%) пациентов 2-й группы отмечалась быстрая эпителизация и преимущественно прозрачное бессосудистое приживление роговичных трансплантатов.

Волкович Т.К. и др. (2016), изучали вопрос диагностических возможностей ИЦ при целом ряде заболеваний, в том числе СЛН [8]. Исследователи сочли данную методику эффективной в диагностике патологического рубцевания при формировании бельм различной этиологии, симблефарона, рубцового пемфигоида. В работе указывается, что множественные фибробласты (в стадии эпителизации) обуславливают формирование грубого помутнения, а морфофункциональные изменения эпителия могут наблюдаться в визуально здоровой зоне.

В 2004 году перед итальянскими исследователями встала задача оценить и соотнести клинические и цитологические особенности дефицита ЛЭСК по наличию в образцах БК, К3 и К19 позитивных клеток [41]. Из 29 пациентов (44 глаза) с клиническим диагнозом СЛН ИЦ не подтвердила диагноз в 18 случаях (62%). У данных пациентов было выявлено отсутствие БК, при этом наблюдалось наличие К3 и К19 позитивных клеток. Это исследование позволяет предположить, что окрашивание на К19 следует проводить в качестве дополнительного теста в тех глазах, где клиническая картина СЛН присутствует, но БК по результатам ИЦ отсутствуют. Наличие врастания конъюнктивального эпителия без БК на поверхности роговицы может объясняться недостаточной точностью окрашивания PAS. Также отсутствие БК может быть связано с изменением микроокружения глазной поверхности вследствие собственно СЛН или основного заболевания. Интересен факт, что порядка 90% образцов с положительным окрашиванием на К19 и отсутствием БК также были положительными на К3, что указывает на то, что СЛН ассоциируется с различной степенью конъюнктивализации: от легкой до тяжелой либо полной.

В 2010 году вышла статья Barbaro V. и соавт. по оценке нарушения глазной поверхности, основанной на ИЦ и конфокальной лазерной

сканирующей микроскопии [67]. В ходе исследования проводился анализ экспрессии К3, К12, К19, муцина MUC1, включая конъюнктиву, лимб и роговицу от 12 здоровых субъектов и 12 пациентов предположительно с СЛН. Полученные результаты свидетельствовали о том, что в роговицах с конъюнктивализацией присутствовал только MUC1 и отсутствовал К12. В образцах здоровых роговиц паттерн экспрессии был обратным: присутствовал только К12, а MUC1 не детектировался. Маркеры К3/К19 показали отсутствие специфичности. Исходя из результатов был сделан вывод о способности К12 и MUC1 четко различать лимб/роговицу и конъюнктиву в образцах отпечатков для цитологии, что является ценным диагностическим инструментом для оценки изменений глазной поверхности и классификации СЛН.

Высокая специфичность роговицы для К12 и высокая специфичность конъюнктивы для К7, К13 и MUC5AC описана и в других исследованиях [148, 98, 86].

Аналогичное исследование было проведено французскими учеными (2011), изучавшими вопрос диагностики СЛН методом ИЦ [97]. Среди пациентов с дефицитом ЛЭСК в 9 образцах из 10 была выявлена экспрессия К13 и К19 и отсутствие К12, который наблюдался лишь в одном случае, клинически самом легком. В таком контексте ученые пришли к выводу, что К3 не специфичен для роговицы, а К13 и К19 являются маркерами дифференцировки конъюнктивального эпителия, в то время как появление К12 может давать оценку тяжести дефицита ЛЭСК.

В связи с вышеописанным исследованием, те же авторы поставили перед собой цель сравнить биомаркеры для верификации СЛН для определения тяжести заболевания. Оценивали биомаркеры характерные для роговицы (К12) и конъюнктивы (К7/К13/К19/MUC5AC). Эпителиальные клетки изучали с помощью ИЦ, наличие клеток конъюнктивы в центральной зоне роговицы было диагностическим доказательством СЛН, в то время как обнаружение остаточных клеток роговицы определяло степень СЛН. В результате ученые пришли к выводу о том, что только К7/К13, являются

высокоспецифичными для дифференцировки конъюнктивы и подтверждают диагноз СЛН, так как они высокоспецифичные и способны преодолевать изменчивость плотности БК. В то время как K19 и12, а также MUC5AC не могут быть рекомендованы, так как не показали должные чувствительность и специфичность. В связи с этим оценка тяжести СЛН не может быть дана с помощью ИЦ [82], так как о нем говорится как о методе, обладающем слабой чувствительностью для диагностики начальной стадии СЛН, при которой БК могут отсутствовать [29, 40].

Для диагностики СЛН Garcia I. и соавт. проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с обратной транскрипцией. Данный метод использовали для выявления специфической мРНК, которая экспрессируется в клетках конъюнктивы. ПЦР обладает высокой чувствительностью к маркерам конъюнктивы, в особенности для обнаружения MUC5AC и представляется более чувствительным, чем использование ИГХ [42].

Не смотря на множество работ, протоколы обнаружения биомаркеров эпителиоцитов конъюнктивы в диагностике СЛН отличаются в разных исследовательских центрах, а стандартизированный единый протокол отсутствует. Кроме того, процедура занимает много времени и требует дорогостоящей лабораторной поддержки. Для того чтобы сделать проведение этого метода широко применимым в практике, требуется дополнительная работа [105].

Тем не менее, в ряде публикаций указываются факторы, влияющие на чувствительность ИЦ в диагностике СЛН, а именно:

- 1) материал, используемый для отбора проб, влияет на результат [104, 154];
- 2) давление, оказываемое фильтром на поверхность глаза, также влияет на результаты отбора проб;
- 3) расположение и размер выборки важны, особенно в случаях неполного СЛН;

4) получение клеток конъюнктивы более эффективно, чем эпителиальных клеток роговицы [71].

Поэтому авторы подчеркивают, что отсутствие эпителиальных клеток роговицы на фильтровальной бумаге не обязательно указывает на отсутствие эпителиальных клеток роговицы на поверхности глаза, как это часто бывает у пациентов с нормальной роговицей.

В данном аспекте интересным является применение лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, которая по мнению ряда работ может быть использована для выявления остаточных клеток лимбального и роговичного эпителия после взятия мазков-отпечатков [68, 90].

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия роговицы

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ) роговицы *in vivo* – это неинвазивный диагностический инструмент для получения прижизненных изображений с высоким разрешением и возможностью получать серию снимков на различных глубинах внутри образца [50, 81, 90, 87, 156, 111].

В настоящее время существуют две коммерчески доступные системы для выполнения ЛСКМ роговицы *in vivo*. Обе пригодны для клинического применения: Confoscan 4 (Nidek Technologies, Япония) представляет собой конфокальный микроскоп с щелевым сканированием белого света, в то время как Гейдельбергский томограф сетчатки 3 с роговичным модулем (HRT3-RCM) от Heidelberg Engineering представляет собой конфокальный микроскоп с точечным сканированием красным лазером [102].

В России для морфологических исследований роговицы *in vivo* применяют как щелевой сканирующий конфокальный микроскоп Confoscan 4, так и лазерный сканирующий конфокальный микроскоп HRT II с Rostock Cornea Module (Heidelberg Engineering GmbH, Германия). У каждого прибора есть свои преимущества и недостатки. HRT II RCM в отличие от Confoscan 4 позволяет получать высококачественные снимки не только роговицы, но и

конъюнктивы, зоны лимба, радужки и капсулы хрусталика. Для получения записи оба прибора работают в ручном, автоматическом и z-скан режимах. Приборы отличаются по размеру исследуемой зоны, при использовании в контактном режиме Confoscan 4 – 460x345 мкм, HRT II RCM – от 300x300 до 400x400 мкм, при работе в бесконтактном режиме Confoscan 4 – 460x690 мкм, HRT II с RCM – от 470x470 до 2000x2000 мкм. Кроме того, они отличаются скоростью получения изображений, при проведении исследований Confoscan 4 – 25 кадров/сек, HRT II RCM – 30 кадров/сек [12].

Для диагностики СЛН, оценке состояния зоны лимба и непрозрачной роговицы используют только HRT с Rostock Cornea Module. Например, клетки эпителия роговицы, конъюнктивы и лимба можно различать на основе их различной клеточной морфологии [38].

Значительные изменения в микроструктуре лимба роговицы были зарегистрированы у пациентов с СЛН, они включали уменьшение плотности базальных эпителиальных клеток, толщины эпителия и плотности суббазальных нервов (SND), а также морфологические изменения (отсутствие четкой границы клеток, увеличение размера базальных клеток, ядер, метаплазия эпителиальных клеток) в зависимости от стадии [38, 127, 88].

С помощью ЛСКМ исследователям удалось проанализировать плотность и извитость суббазальных нервов у пациентов с СЛН [40]. В результате было выявлено, что степень извитости нервов была значительно выше у пациентов с СЛН, чем у здоровых лиц, и различалась между ранними, промежуточными и поздними стадиями СЛН. Снижение общей суббазальной плотности нервов и плотности длинных нервов положительно коррелировало с тяжестью СЛН. Также авторы указали на необходимость дальнейших долгосрочных исследований для выяснения обратимости изменений нервов после лечения СЛН.

Ряд научных работ предлагает использование *in vivo* ЛСКМ для визуализации микроструктур тканей поверхности глаза на клеточном уровне. Указываются такие преимущества данного метода перед ИЦ, как получение

результата в реальном времени и хорошая повторяемость, возможность более точного определения наличия бокаловидных клеток или конъюнктивоподобных эпителиоцитов на роговице, изменения клеточной морфологии, плотности базального эпителия, толщины эпителия и суббазального нервного сплетения [8, 44, 64, 84, 103, 152].

Обнаружение ниши ЛЭСК с помощью ЛСКМ позволило выявить структурные различия лимба здоровых субъектов и в случаях дефицита ЛЭСК, где палисады могут быть разрушены или отсутствовать вовсе или быть покрытыми новообразованными сосудами с большим количеством воспалительных клеток, которые имеют тенденцию к рассеиванию при выполнении снимка. Также авторы указывают на факт пигментации кожи пациента, который является дополнительным фактором, влияющим на оценку морфологии палисад [102, 127, 88].

Оптическая когерентная томография роговицы

Оптическая когерентная томография переднего сегмента (ОКТ) появилась в качестве альтернативного, неинвазивного метода визуализации пациентов с СЛН [25, 48, 66, 91, 92].

Хотя ОКТ не обеспечивает такой степени разрешения на клеточном уровне, как ЛСКМ, она может оказаться полезной для измерения толщин эпителия и фиброваскулярного паннуса, оценки палисад Вогта и лимбальных крипт, визуализации перехода между гипорефлективным эпителием роговицы и гиперрефлективным эпителием конъюнктивы в зоне лимба [125,145].

По этому поводу Воскресенской А.А., Поздеевой Н.А. с соавторами (2017) было проведено исследование по оценке информативности визуализации лимбальных палисад Вогта при помощи ОКТ [4]. Авторы сравнивали участки при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии лимбальной зоны у пациентов с СЛН и у здоровых добровольцев. В ходе исследования оценивали степень визуализации, деформации и рефлективность крипт, сосудистые аркады, суббазальные

нервные сплетения. В результате авторы отметили, что визуализация лимбальных крипт в верхнем лимбе по данным ЛСКМ их контуры на снимках ОКТ либо четко не визуализировались, либо были с трудом отличимы от тени поверхностных кровеносных сосудов или глубже лежащих волокон склеры в месте их корнеосклерального перехода. В отличие от палисад верхней половины роговицы, крипты нижнего лимба визуализировались лучше обоими методами исследования. Так же были отмечены ограничения метода, связанные с длительностью процедуры, невозможностью проведения у пациентов младшего возраста, особенно при наличии нистагма и отсутствии фиксации взгляда.

В 2020 году Liang и соавт., используя AS-ОСТ проводили одно- и трех-точечное измерение центральной толщины эпителия роговицы (ЦТР) и максимальную толщину лимбального эпителия (МЛТЭ) в верхнем, нижнем, назальном и височных сегментах здорового глаза и глаза с СЛН [46]. Полученные изображения ЦТР-1 и ЦТР-3 сравнивали с ЛСКМ. В результате были описаны более низкие значения ЦТР и МЛТЭ у пациентов с СЛН в сравнении со здоровым глазом. Авторы отметили, что применение таких параметров по ОСТ может быть использовано для подтверждения диагноза СЛН. При этом, параметры ЦТР и МЛТЭ зависят от стадии и давности, следовательно, могут быть полезны только для количественной оценки.

Оптическая когерентная томография переднего отрезка глаза в режиме ангиографии

Оптическая когерентная томография-ангиография (ОКТА) имеет большую диагностическую ценность для визуализации глазного кровотока в сосудах без использования красителей, таких как флуоресцеин или индоцианиновый зеленый [94].

Ang M. и соавт (2015) были первыми, кто применил и оценил ОКТА для визуализации сосудистой сети переднего сегмента [124].

В 2017 году Yoshinori Oie и соавт. использовали ОКТА переднего отрезка для визуализации неоваскуляризации роговицы у пациентов с СЛН и сравнивали их со снимками фотоцелевой лампы [122]. По результатам исследования ОКТА имело 2 преимущества. Во-первых, ОКТА может четко показывать неоваскуляризацию в случаях с тяжелым помутнением роговицы. Во-вторых, ОКТА может обнаруживать не только крупные, но и мелкие сосуды. Тем не менее, при биомикроскопии более-менее прозрачной роговицы, мелкие сосуды визуализируются с трудом. Причиной этому вероятно, является схожесть цвета сосудов и радужной оболочки. Благодаря ОКТА возможна четкая визуализация даже самых мелких капилляров. По мнению авторов эти два преимущества позволяют ОКТА использовать для будущих исследований, для объективной и неинвазивной оценки неоваскуляризации роговицы при различных патологиях.

В исследовании Nanji и соавт. (2019) использовали ОКТА для оценки глубины залегания сосудов при различной патологии, сочетанной с неоваскуляризацией роговицы, в том числе в двух случаях СЛН [28]. В первом случае СЛН развился после неудачной СКП и сочетался с поверхностной неоваскуляризацией на глубине 156 микрон. Во втором случае СЛН развился на фоне синдрома Стивена-Джонсона, при этом сосуды располагались на глубине 200-250 мкм. По мнению авторов, ОКТА роговицы обеспечивает точную количественную оценку глубины сосуда *in vivo*, является неинвазивным методом, позволяет изучить только функционально-активные сосуды и легко воспроизводима в идентичных участках в динамике.

Ретроспективное исследование W. Binottia и соавт. (2020) демонстрирует возможности ОКТА при СЛН для изучения не только глубины залегания сосудов, но и площади неоваскуляризации [149]. Авторы разделили группы пациентов по клиническим стадиям и изучали различия в сосудистой системе лимба в ранние сроки. Так, авторы выяснили, что показатель глубины залегания сосудов полезен для дифференциации II и III стадии заболевания и может служить потенциальным прогностическим фактором тяжести СЛН.

Они также продемонстрировали, что площадь поверхностной неоваскуляризации значительно увеличивается на ранних стадиях заболевания, в то время как толщина сосудов значительно увеличивается на III стадии. Таким образом, данные параметры в сочетании с клинической оценкой, могут быть полезными инструментами для определения стадии заболевания и мониторинга её тяжести. В исследовании также выявили ограничения метода, связанные с необходимостью выполнения серии снимков в связи с ограниченным рабочим полем размерами 6x6 мм. Аналогичным образом, было показано, что современная технология ОКТА обеспечивает более низкое качество изображения и обнаружение меньшего количества сосудов малого диаметра по сравнению с ангиографией с использованием флуоресцеина. Тем не менее, ОКТА была способна обнаруживать значительные сосудистые изменения без введения красителей.

В 2021 году S. Varma и соавт. исследовали особенности ОКТ переднего отрезка с высоким разрешением (HR-ОКТ) и ангиографии HR-ОКТА у пациентов с подтвержденным СЛН по результатам ИЦ и конфокальной микроскопии, здоровых добровольцев и пациентов с другими заболеваниями глазной поверхности [76]. В каждой группе проводился анализ средней отражательной способности эпителия и стромы, а также средней плотности сосудов. По результатам НРТ-ОКТ на глазах с СЛН была выявлена высокая отражательная способность эпителия и низкая рефлексивность стромы, в отличие от глаз с другими заболеваниями роговицы, схожими с СЛН. Метод HR-ОКТА выявил повышенную плотность сосудов и потерю петлистого рисунка строения лимбальных сосудов у пациентов с СЛН, в отличие от других групп. По мнению авторов, ангиографические изображения требуют сложных технологий для анализа; тем не менее, они помогают в диагностике и могут стать методом анализа в будущем.

Синдром лимбальной недостаточности и кератопластика

Случаи реакции отторжения трансплантата роговицы по данным литературы колеблются от 2,3% до 65% в зависимости от факторов риска, имеющих место у реципиента [126, 138]. Наличие СЛН является таким фактором, и относится к категории кератопластик высокого риска [78, 135]. Другими причинами возникновения СЛН помимо ожоговой травмы, являются перенесенные кератиты, опухоли конъюнктивы, обширная хирургия в области лимба, синдром Стивенса-Джонсона, глазной пемфигоид, а также предшествующие неудачные кератопластики [9, 11, 15, 71, 73, 74].

Повышенный риск отторжения в случае повторной кератопластики обусловлен избыточной сенсibilизацией реципиента, что может служить стимулом для васкуляризации роговичного ложа, что, в свою очередь, дополнительно повышает риски [99].

Как известно, трансплантация лимбальных клеток не существенно влияет на инверсию новообразованных сосудов, особенно расположенных глубоко. В этой связи, даже после успешного восстановления эпителиального слоя роговицы, таким пациентам, в большинстве случаев, необходима сквозная или послойная пересадка роговицы [33, 47, 77, 83, 131, 137, 147].

В то же время неоваскуляризация ложа реципиента в 2-х и более квадрантах с глубоко расположенными сосудами, заходящими, по крайней мере, на 2 мм в строму, является фактором риска, связанным с высокой вероятностью развития реакции тканевой несовместимости [138]. Более того, наличие сосудов в четырех квадрантах удваивает риск отторжения, увеличивая тяжесть иммунной реакции [31].

По данным литературы, характер приживления кератотрансплантата в 70-80% наблюдений находится в прямой зависимости от предоперационной активации иммунитета и послеоперационной динамики его показателей: от соотношения пулов отдельных популяций иммунокомпетентных клеток, количества циркулирующих иммунных комплексов, уровней антител и цитокинов, в первую очередь интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и фактора некроза

длительной иммуносупрессивной терапии. Нередко обнаруживаются повреждения лимбального трансплантата в ходе операции [35, 99]. Технология аутологичной трансплантации культивированного лимбального эпителия - Cultivated limbal epithelial transplantation (CLET) является одной из наиболее эффективных для восстановления эпителиального слоя роговицы [24, 62, 108, 140]. Однако, описанный метод культивации *in vitro* является весьма дорогостоящим и не исключает явления периферической васкуляризации с конъюнктивализацией (Nakamura T. et al., 2016). Так же проводились операции с забором клеток от кадаверных глаз allo-CLET (Schwab I.R. et al., 2000), с применением длительной иммуносупрессивной терапии, которая несет в себе известные системные риски. В 2012 году V. Sanqwan с соавторами предложил технику простой лимбальной эпителиальной трансплантации - Simple limbal epithelial transplantation (SLET), суть которой заключается в иссечении 1,5-2 мм лимба на здоровом глазу, его разрезание на равные части и укладывание на предварительно приклеенную фибриновым клеем человеческую амниотическую мембрану (чАМ) глаза - реципиента, сверху накладывается мягкая контактная линза [143,144]. В 2018 г. профессором Малюгиным Б.Э. и соавторами была предложена модификация SLET - простая бесклеевая эпителиальная трансплантация - Glueless Simple Limbal Epithelial Transplantation (G-SLET) [113, 54]. Суть данной операции заключается в иссечении фиброваскулярной ткани пораженного глаза и помещении лимбальных ауто трансплантатов в туннели, расположенные по периферии роговицы (без использования фибринового клея).

1.5. Заключение по обзору литературы

Исходя из данных литературы можно сделать вывод о том, что СЛН это полиэтиологическое заболевание глазной поверхности, диагностика которого не может быть ограничена биомикроскопией или даже биомикроскопией в сочетании с окрашиванием роговицы. Использование низкомолекулярного флюоресцеина (нмФЛ) дает возможность быстрого скрининга на наличие или

отсутствие физиологических или патологических паттернов. Углубляясь в диагностику СЛН, следует отметить, что гистологическое исследование не является прижизненным и малоинвазивным вариантом диагностики, поэтому оно не является основополагающим, и может быть использовано только в качестве подтверждения поставленного диагноза *post factum* проведенного хирургического лечения [3].

Метод выполнения мазков-отпечатков является доступным, не инвазивным, однако зависит от качества диска, методики забора клеток, способа хранения и типа красителей. Более того метод требует специальных навыков окрашивания, дополнительного лабораторного оборудования и обученного персонала. Тем не менее, данная методика ценна так как может показать прижизненную экспрессию белков эпителиального или конъюнктивального происхождения. Однако, исходя из анализа большого количества работ БК конъюнктивы могут полностью отсутствовать у пациентов с другими заболеваниями глаз, такими, как например кератинизация [60,72]. Следовательно обнаружение БК конъюнктивы подтверждает диагноз СЛН, но их отрицательный результат не исключает СЛН. Иммуноцитохимическое исследование, позволяет более точно обнаруживать внутриклеточные и секретируемые белки, которые экспрессируются в эпителиальных клетках роговицы и бокаловидных клетках конъюнктивы [66]. Тем не менее, существуют противоречивые данные относительно специфичности К19 [39, 53, 67, 96, 98].

Диагностика при помощи AS-OCT и AS-OCTA является перспективной в отношении оценки динамики васкуляризации, предоперационной оценки толщины роговицы, количественной и качественной оценки эпителия и т.д. Однако, эти методики носят лишь вспомогательный характер и имеют более существенное значение в выборе метода кератопластики, а также определении степени риска отторжения трансплантата. Конфокальная микроскопия роговицы, как прижизненный метод исследования, может быть использован для выявления плотности и извитости суббазальных нервов и обратимости

данных изменений в ходе лечения [40]. Она также позволяет проанализировать морфологические изменения эпителиальных, клеток роговицы и БК конъюнктивы. Однако, пациентам с выраженными рубцовыми изменениями или отсутствием возможности фиксации взгляда, проведение такого исследования остается затруднительным. Более того, для выполнения этого исследования требуется дорогостоящее оборудование.

Таким образом, для корректной диагностики СЛН необходима осведомленность врачей и настороженность, в особенности у пациентов с васкуляризированными бельмами. Биомикроскопическая картина СЛН у такой категории пациентов не всегда очевидна. Именно поэтому диагностика должна включать комплексный подход и разные методы исследования. В таблице №1 суммированы краткая характеристика всех вышеописанных методов диагностики СЛН с их достоинствами и недостатками.

Предложено множество вариантов хирургического лечения пациентов с односторонним СЛН (таблица №2), которые имеют ряд достоинств. Например, для аутологичной трансплантации — это возможность забора материала из здорового глаза (CLAU, KLAU, SLET, G-SLET). Недостаток культивирования клеток, изъятых из здорового глаза (EVLAU), заключается в том, что исходная биопсия может содержать недостаточное количество голоклонов, а сама процедура при этом требует специального оборудования и является крайне дорогостоящей. Другие виды хирургического лечения зависят от наличия свежего донорского материала (с-CLAL, KLAL, EVc-LAL), что также является несомненным недостатком. Применение в качестве донорской ткани аллогенного материала (от живого родственника или донора Lr- CLAL, lnr -CLAL) требует длительного протокола иммуносупрессивной терапии, что негативно сказывается на общем здоровье пациентов. Тем не менее наиболее щадящей и эффективной методикой пересадки ЛЭСК является техника SLET, однако в России из-за невозможности использования фибринового клея, была предложена новая техника G-SLET, которая исключает использование клея, и является сопоставимой по эффективности [54].

Таблица 1 — Краткая характеристика методов диагностики СЛН.

Методика исследования	Диагностические возможности	Достоинства	Недостатки
<p>Окрашивание нмФЛ</p> <p>Окрашивание лиссаминовым зеленым</p>	<p>Роговичное окрашивание (в норме роговица не окрашивается): или может иметь точечное прокрашивание «punctate staining»;</p> <p>Конъюнктивальное окрашивание: в виде бороздок «furrow staining»;</p> <p>Окрашивание при СЛН: в виде завитка или вихря «vortex pattern staining» или воронкообразная эпителиопатия «whorl-like epitheliopathy»;</p> <p>Окрашивает мертвые эпителиальные клетки и слизь.</p>	<p>Не инвазивный, метод «быстрой» диагностики;</p> <p>Возможность оценки качества реэпителизации в послеоперационном периоде;</p> <p>Возможность одновременной оценки времени разрыва слезной пленки;</p> <p>Возможность фотографирования с целью динамического сравнения;</p>	<p>Не всегда точно подтверждает диагноз СЛН;</p> <p>Может вызывать аллергические реакции;</p>
Гистология	<p>БК, наличие новообразованных сосудов, морфология клеток, характер клеточной инфильтрации;</p>	<p>Подтверждение диагноза СЛН, возможность послойной оценки ткани, использование стандартных методов окрашивания;</p>	<p>Не является дооперационной диагностикой. Сложность равномерного забора цельного материала во время операции. Сложность препарирования паннуса;</p>
ИЦ и ИЦХ	<p>БК и муцины; MUC5AC MUC1 кератины К3/К12 (роговичный эпителий)</p>	<p>Использование стандартных красителей, возможность многократного</p>	<p>Сложность забора клеток. Необходимость группы контроля (здоровый глаз)</p>

	<p>К10 (эпителиальные, кератинизированные) К7 (железистый эпителий) К8+18 (переходный эпителий) К 13 (плоский неорогевавающий, переходный эпителий) К 19 (железистый эпителий)</p>	<p>окрашивания и хранения образцов;</p> <p>Дооперационной метод диагностики, выявляющий экспрессию более специфических белков на поверхности роговицы и конъюнктивы- К.</p>	<p>Возможность травматизации роговицы во время забора клеток.</p> <p>Не специфично для каждого случая, следовательно не подтверждает диагноз в полной мере.</p> <p>Необходимость применения большого количества дорогостоящих красителей.</p> <p>Сложность протокола окрашивания.</p> <p>Отсутствие единого мнения специфичности.</p> <p>Не однократный забор материала в случае выбраковки образца.</p>
ЛСКМ	<p>БК или конъюнктивоподобные эпителиоциты, изменения клеточной морфологии, плотность и толщина базального эпителия, суббазального нервного сплетения, извитость нервов</p>	<p>Не инвазивный метод диагностики.</p> <p>Получение результата в реальном времени.</p> <p>Хорошая повторяемость метода.</p>	<p>Не подтверждает точно диагноз СЛН.</p> <p>Необходимо дорогостоящее оборудование.</p> <p>Плохая четкость конфокальных изображений роговицы из-за изменений во внеклеточном матриксе</p>

			<p>роговицы может затруднить визуализацию.</p> <p>Из-за наличия клеток конъюнктивы и воспалительной клеточной инфильтрации может наблюдаться увеличение отражательной способности стромы роговицы.</p> <p>Невозможно проведение исследования на глазах с сильным рубцовыми изменениями</p>
ОКТ переднего отрезка глаза	<p>Эпителиальные и пахиметрические карты.</p> <p>Сагиттальный срез роговицы</p> <p>Гиперрефлексивность стромы, наличие рубцовых изменений и грубых помутнений.</p> <p>Выявления палисад Фогта и диагностика состояния лимбальной зоны.</p>	<p>Не инвазивный метод.</p> <p>Возможности оценки изменения толщины роговицы и характера эпителия.</p> <p>Возможности ручного просчета толщины интересующих участков роговицы.</p> <p>Хорошая повторяемость.</p> <p>Возможности сравнительной оценки в послеоперационном периоде.</p>	<p>Не дает в полной мере диагностировать СЛН.</p> <p>Сложность выполнения у пациентов с отсутствием фиксации взора.</p> <p>Неточность в просчете эпителиальной карты у пациентов с тяжелом течением ССГ и при неравномерной форме роговицы.</p>

		Высокое разрешение метода.	
ОКТ-А переднего отрезка глаза	Глубина залегания сосудов Возможности их качественной и количественной оценки Выбор кератопластики в зависимости от вовлеченности сосудов	Не инвазивный метод. Возможности сравнительной оценки в послеоперационном периоде.	Не подтверждает диагноз СЛН. Сложность выполнения из-за большого количества настроек «вручную» Длительная процедура для получения качественного снимка Сложность выполнения у пациентов с отсутствием фиксации взора.
Цитокины в слезе	Определение концентрации про-воспалительных и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, факторов некроза опухоли и их качественная и количественная оценка.	Не инвазивный метод Анализ каждого случая в реальном времени. Возможность осознанного подбора терапии. Прогноз исхода кератопластики.	Требуется дополнительное оборудование и дорогостоящие реагенты для проведения ИФА, обученный персонал и лаборатория.

Сокращения: нмФЛ – низкомолекулярный флюоресцеин; ОКТ- Оптическая когерентная томография; ОКТ-А - Оптическая когерентная томография ангиография, ЛСКМ- лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; ИЦ – импрессионная цитология; ИЦХ – иммуноцитохимия.

Таблица 2 — Краткая характеристика методов хирургического лечения при одностороннем СЛН

Аббревиатура	Расшифровка	Донор	Достоинства	Недостатки
Лимбальная трансплантация при одностороннем СЛН Limbal Transplantation in unilateral LSCD				
CLAU	Conjunctival limbal autograft	Парный глаз пациента	Возможность комбинирования операции с устранением симблефарона	Травматичность Риск развития СЛН на здоровом парном глазу
Lr-CLAL	Living related conjunctival limbal allograft	Глаз живого родственника	Возможность применения при двухстороннем СЛН	Необходимость длительной иммуносупрессии
Inr-CLAL	Living nonrelated conjunctival limbal allograft	Глаз живого донора	Тканеспецифическая реконструкция эпителия	Риск развития СЛН на здоровом глазу донора Зависимость от наличия донорского материала
c-CLAL	Cadaveric conjunctival limbal allograft	Кадаверный глаз		
KLAU	Keratolimbal autograft	Парный глаз пациента	Менее выраженная травматичность для глаза-донора	Травматичность Риск развития СЛН на здоровом парном глазу
KLAL	Keratolimbal allograft	Кадаверный глаз		Необходимость длительной иммуносупрессии Зависимость от наличия донорского материала
SLET	Simple limbal epithelial transplantation	Парный глаз пациента	Малая травматичность Высокая эффективность	Необходимость использования фибринового клея (не сертифицированного в РФ)

G-SLET	Glueless Simple limbal epithelial transplantation	Парный глаз пациента	Малая травматичность Высокая эффективность	Требует высокого хирургического навыка
Культивирование лимбальных эпителиальных стволовых клеток CLET Cultivated Limbal Epithelial Transplantation				
EVLAU	Ex vivo cultivated limbal autograft	Парный глаз пациента	Малая травматичность Высокая эффективность	Очень высокая цена Сложное в производстве Исходная биопсия может содержать недостаточное количество стволовых клеток. Зависимость от донорского материала Экспансия стволовых клеток Ex-vivo-сложная, трудоемкая и дорогостоящая процедура.
EVc-LAL	Ex vivo cultivated cadaveric limbal allograft	Кадаверный глаз		
EVlr-LAL	Ex vivo cultivated living related limbal allograft	Глаз живого родственника		
EVlnr-LAL	Ex vivo cultivated living non-related limbal allograft	Глаз живого донора (не родственника)		

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данная глава разделена на два подраздела: первый представлен материалами и методами экспериментальной части исследования, которая посвящена: а) культивированию клеток от лимбальных трансплантатов на различных культуральных средах; б) моделированию процессов ре-эпителизации с помощью культивирования ЛЭСК на различных слоях кадаверных роговиц; Все исследования были проведены в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (руководитель д.м.н., проф. Борзенко С.А). Второй подраздел посвящен анализу клинично- функциональных исследований и хирургического лечения 24 пациентов (24 глаза) с односторонним СЛН в ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в период с 2019 по 2022 годы. Все представленные операции были выполнены одним хирургом (д.м.н., проф., член-корр. РАН Малюгин Б.Э.). Сбор жалоб, анамнеза, проведение и анализ результатов дооперационных и послеоперационных исследований выполнены автором.

2.1. Материалы и методы экспериментальной части исследований

2.1.1. Определение иммунофенотипа клеток из культивированных лимбальных трансплантатов. Часть 1.

Получение первичной культуры ЛСК

Лимбальные трансплантаты получены из 2 части эксперимента от донорских роговиц 3А, при этом выполнялось механическое иссечение лимба по окружности с последующей фрагментацией. Лимбальные трансплантаты были посажены в две чашки Петри по 8 кусочков в каждую и накрыты стерильным покровным стеклом. Культуру ЛСК получали методом миграции клеток из кусочков лимба донорских роговиц с использованием двух видов культуральных сред. Для стимулирования роста ЛЭСК использовали низкокальциевую базовую среду EpiLife (0,06 мМ Ca⁺⁺) с добавлением антибиотиков и антимикотиков: пенициллина (100 U/мл), стрептомицина (100

мкг/мл) и амфотерицина В (0,25 мкг/мл); фетальной бычьей сыворотки (5%); инсулина растворимого человеческого генно-инженерного короткого действия (5 мкг/мл); гидрокортизона (5 мкг/мл), человеческого рекомбинантного эпидермального фактора роста (10 нг/мл). Для стимулирования роста Л-МСК роговицы [20] использовали базовую среду DMEM/F12 (1:1) (1,05 mM Ca⁺⁺) с добавлением антибиотиков и антимикотиков: пенициллина (100 U/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и амфотерицина В (0,25 мкг/мл); фетальной бычьей сыворотки (10%); инсулина растворимого человеческого генно-инженерного короткого действия (4 мкг/мл), L-глутамина (2 mM), дексаметазона (10 нМ). Для получения первичной культуры подготовленные кусочки лимба помещали на дно сухой чашки Петри, прижимали сверху стерильным предметным стеклом и добавляли под стекло 500 мкл соответствующей среды. Далее чашки помещали на 36 часов в инкубатор и затем добавляли по 1,5 мл соответствующей среды в чашки. После этого замену полной культуральной среды осуществляли каждые 2–3 дня.

Культивирование осуществляли 21 день до достижения 70–80% конфлюентности и пересаживали в лунки слайд-флаконов. Для этого из чашки аспирировали культуральную среду, удаляли стекло. Добавляли 500 мкл раствора фермента аккутазы и аспирировали. Затем снова добавляли 1,0 мл раствора аккутазы и помещали в инкубатор (при температуре +37 °C) на 10 минут. Контроль открепления клеток проводили на фазово-контрастном микроскопе. Суспензию клеток из чашек Петри собирали по отдельности в две 15 мл пробирки, добавляли соответствующую культуральную среду до объёма 12 мл и центрифугировали при 200g в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем жидкость аспирировали, добавляли в каждую пробирку по 1 мл соответствующей среды и ресуспендировали полученные клетки. Часть (10 мкл) суспензии использовали для подсчёта концентрации клеток. Затем суспензию рассеивали в лунки 4-х луночного слайд-флакона из расчёта 5×10^5 клеток на 1 см^2 . По достижении культурой клеток 70–80% конфлюентности в

лунке слайд-флакона, проводили их фиксирование и окраску полученных культивированных клеток (иммунофенотипирование) и проточную цитофлюориметрию. На рисунке 5 представлена схема экспериментальной части по определению иммунофенотипа клеток.

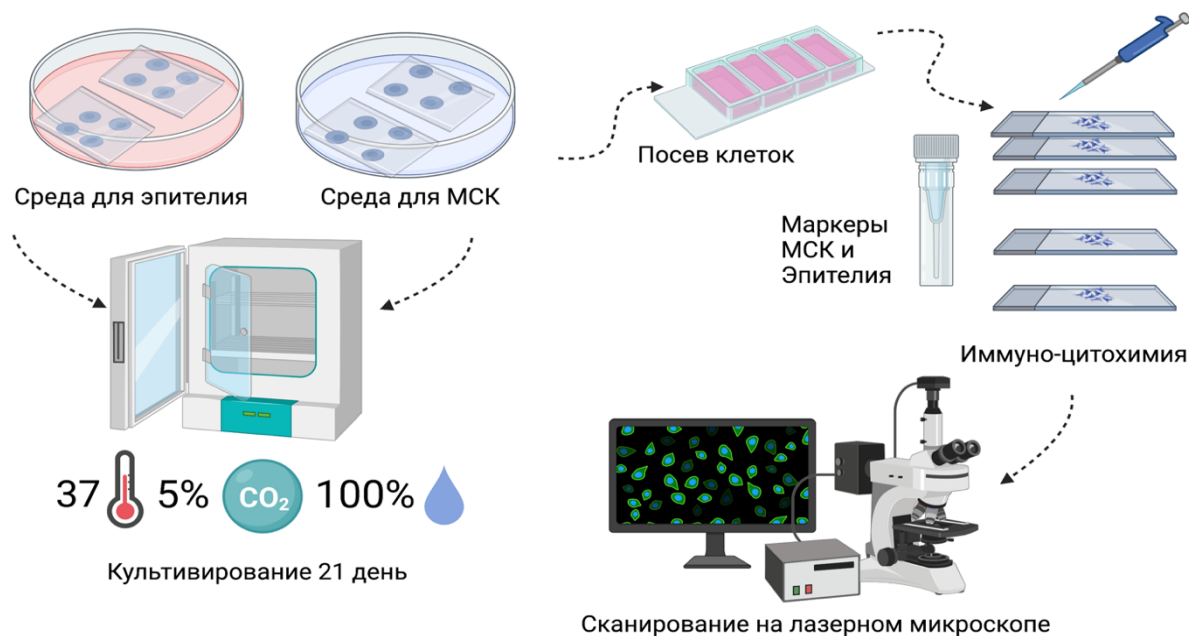


Рисунок 5 — Схематическое изображение экспериментальной части по определению иммунофенотипа клеток.

Иммунофенотипирование культуры ЛСК

Окраску клеток ЛСК, культивированных на двух видах культуральных сред, проводили методом ИЦХ окрашивания на следующие маркеры (Рисунок 6):

- 1) для подтверждения пролиферативной активности клеток использовали первичные антитела к ядерным маркерам Ki67 [128];
- 2) для подтверждения наличия ЛЭСК в культуре – специфический маркер ABCG2, локализующийся в ядре [26];
- 3) для подтверждения эпителиальной природы клеток – маркер плотных межклеточных контактов (ZO-1, коннексин 43) [157];
- 4) для подтверждения клеток эпителия роговицы – маркеры специфических кератинов (3, 12) и [117];

- 5) для изучения экспрессии Л-МСК роговицы – маркеры CD 73, 90, 105 [20];
- 6) маркер базальных клеток эпителия кератин 19 и интегрин 1b (CD29) [95].
- 7) маркер перехода мезенхимоподобных клеток в эпителиальные виментина [155].



Рисунок 6 — Схематическое изображение и характеристики клеточных маркеров.

Окраску культуры клеток проводили в 4-х луночных слайд-флаконах по стандартной методике. Сначала клетки отмывали от культуральной среды и фиксировали. Затем проводили пермеабиллизацию для повышения проницаемости мембран. Далее окрашивали клетки первичными антителами, а затем вторичными антителами, мечеными флюорохромами. В конце окрашивали клеточные ядра и выполняли сборку слайдов для исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе.

Использовался следующий пошаговый протокол окраски культуры ЛСК:

шаг 1 – аспирация культуральной среды из лунок слайд-флаконов;

шаг 2 – отмывание от культуральной среды раствором фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4) трехкратно по 5 минут при температуре 25°C;

шаг 3 – фиксация клеток 10% нейтральным раствором формалина (pH 7,4) в течение 10 минут при температуре 25°C;

шаг 4 – отмывание клеток от фиксатора раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25°C;

шаг 5 – пермеабелизация клеточных мембран 0,3% раствором тритона X-100 в PBS в течение 15 минут при температуре 25°C;

шаг 6 – отмывание клеток от раствора тритона X-100 раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25°C;

шаг 7 – инкубирование образцов в блокирующем растворе (5% фетальной бычьей сыворотки и 0,1% сапонины, разведённые в фосфатно-солевом буфере) для снижения уровня неспецифического связывания антител в течение 1 часа при температуре 25°C;

шаг 8 – окрашивание клеток первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе, в течение 16 ч при температуре 4 °C. Для выявления экспрессии маркеров использовали первичные антитела в определённом разведении: K3 (1:50), K12 (1:100), K19 (1:100), ABCG2 (1:200), Ki67 (1:200), виментину (1:500), коннексину 43 (1:500), ZO-1 (1:100). В контрольные лунки первичные антитела не добавляли, а использовали тот же объем блокирующего раствора.

шаг 9 – отмывание клеток от первичных антител раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25°C;

шаг 10 – окрашивание образцов вторичными антителами, разведенными в блокирующем растворе, в темноте в течение 1 ч при температуре 25°C. Для выявления первичных антител связанных с эпитопом использовали вторичные антитела Alexa Fluor 488 или 594 (1:250), конъюгированные с флуорохромным красителем в соответствии с антигенной принадлежностью первичного (кролик или мышь), которые добавляли во все лунки;

шаг 11 – отмывание клеток от раствора с вторичными антителами раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25°C;

шаг 12 – окрашивание ядер клеток бис-бензидимом (Hoechst 33258) в концентрации 0,1 мг/мл в растворе PBS в течение 10 минут при температуре 25°C;

шаг 13 – разборка слайд-флаконов и монтирование под покровное стекло средой для заключения гистологических препаратов;

шаг 14 – хранение готовых препаратов до выполнения лазерной сканирующей конфокальной микроскопии при температуре 4°C не более 48 часов.

Анализ экспрессии маркеров в культурах ЛСК

Экспрессию ядерных маркеров p63, ABCG2, и Ki 67 оценивали как флюоресцентную окраску, совпадающую по форме и месту с контрастированным ядром. Число ядер, окрашенных бис-бензидимом (синий) и экспрессирующих ABCG2 (красный), Ki67 (зелёный), подсчитывали в программе Fiji [69] с помощью плагина “Cell Counter” и выражали в %. Экспрессию виментина оценивали полуавтоматически в программе CellProfiler 2.0 [34], используя алгоритм “Human cells” (клетки человека), исключая зону ядра с коррекцией на уровень фоновой флюоресценции контроля. Экспрессию остальных цитоплазматических и мембранных маркеров (K3, K12, K19, CD 29, CD 90, CD 105, коннексин 43, белок ZO-1) оценивали по отношению к фоновой экспрессией вторичных антител в контроле и выражали в условных значениях: 0 – нулевая или сравнимая с фоновой, (+) – слабая, (++) – умеренная, (+++) – выраженная.

Проточная цитофлюориметрия первичной культуры клеток из лимбальных трансплантатов.

Для верификации экспрессии маркеров в первичной культуре клеток из лимбальных трансплантатов проводилось цитофлюориметрическое исследование по стандартному протоколу. Анализировали маркеры,

характерные для МСК лимба роговицы: CD 73, 90, 105 (положительные), маркер стволовости - CD 34 (отрицательный) [145]. Оценивали экспрессию маркера CD 29 (или интегрин $\beta 1$) характерного для эпителиальных клеток, и общий профиль положительных и отрицательных маркеров для сравнения с классическим профилем МСК и ЛЭСК по данным ряда исследований [145,146,147].

Для этого клетки культивировали в среде EpiLife (0,06 мМ Ca^{++}) по достижении 70-80% конfluентности получали суспензию клеток первичной культуры из лимбальных трансплантатов путём их инкубирования с ферментом аккутаза (A1110501, Gibco, США) по стандартному протоколу производителя. После получения суспензию окрашивали антителами с флюорохромами к указанным маркерам согласно инструкции производителя.

Использовался следующий пошаговый протокол:

шаг 1 - отмывание клеток в чашке Петри от культуральной среды в PBS. 3-хкратно по 5 минут.

шаг 2 - инкубирование клеток с ферментом аккутаза 1 мл 10 минут при $+37^{\circ}\text{C}$.

шаг 3 - сбор суспензии микропипеткой в центрифужную пробирку и разбавление полученной суспензии полной культуральной средой до 12 мл.

шаг 4 - клетки осаждали при 200g при комнатной температуре в течение 5 минут на центрифуге.

шаг 5 - затем клетки разбавляли в 2,0 мл буфера (CellWASH) и встряхивали на при 600g на микроцентрифуге

шаг 6 - полученную суспензию разделяли на равные части с учетом выполнения изотипических контролей для указанных антител.

шаг 7 - окрашивание указанными антителами согласно инструкции производителя.

шаг 8 - отмывание суспензии от антител путём ресуспендирования в буфере однократно и осаждение при 200g в течение 5 минут;

шаг 9 – ресуспензирование всех образцов в 500 мкл буфера;

шаг 10 – выполнение цитофлюориметрического исследования на проточном цитофлюориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Использовали единый протокол регистрации событий по каждому из антител с учетом флюоресценции изотипических контролей. Данные получали и первично анализировали в программе CytExpert 2.2 (Beckman Coulter, США).

2.1.2. Экспериментальное моделирование и изучение процессов ре-эпителизации лимбальных эпителиальных стволовых клеток в эксперименте *ex vivo*. Часть 2.

Для выполнения моделирования ре-эпителизации использовали трансплантацию лимбальных фрагментов на две роговицы, полученные от одного донора ЗА (с жизнеспособными клетками стромы) из Глазного Тканевого Банка (ГТБ) ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Моделирование выполняли в условиях операционной следующим образом: парные глазные яблоки после стандартной деконтаминации закрепляли в глазном держателе, далее при помощи ножниц производилась отсепаровка конъюнктивы, затем выделение кольцевидного трансплантата лимба при помощи одноразового офтальмологического ножа. Кольцевидный трансплантат лимба был фрагментирован на равное количество прямоугольных микро-трансплантатов (являющихся источником аутологичных ЛСК для двух частей эксперимента). У одной пары роговиц микрокератомом были удалены эндотелий с частью стромы (для задней послойной кератопластики), после чего оставшуюся роговицу (без эндотелия) выворачивали стромой вверх и обозначали как (“роговица БМ–“), вторая пара оставалась с сохранённой БМ и эндотелием (“роговица БМ+“). Затем, на каждой роговице при помощи копьевидного ножа формировали 8 туннелей согласно протоколу операции G-SLET. Далее полученные из выкроенной лимбальной зоны микро-трансплантаты помещали в каждый из тоннелей случайным образом в обеих роговицах (склеральным концом внутрь, роговичным – наружу). После этого роговицы помещали в 6-

луночный планшет и каждую лунку заполняли 5 мл среды EpiLife (0,06 мМ Ca⁺⁺). Культивирование проводили в стандартных условиях в течение 24 дней. Полную смену культуральной среды выполняли 3 раза в неделю. Далее роговицы фиксировали в растворе нейтрального 10% формалина и делили на 3 равных части: с первой выполнялось гистологическое исследование (гематоксин-эозин Г-Э), вторая часть использовалась для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), с третьей частью было произведено иммуногистохимическое исследование (ИГХ) на маркеры эпителия К3, К12, К19; пролиферации p63; и Л-МСК клеток CD90, CD105.

Окраска гистологических препаратов после моделирования трансплантации лимбальных роговичных мини-трансплантатов

Образцы роговиц с микро-трансплантатами после культивирования отмывали в PBS трижды в течение 10 минут и помещали раствор формалина для фиксации в течение 24 часов при 24 °С. Затем каждую роговицу разрезали на 3 части для выполнения: 1) Для гистологического исследования препараты 1/3 роговицы заключали в парафин, выполняли поперечные срезы толщиной 5 мкм и окрашивали Г-Э согласно стандартному протоколу. Готовые гистологические препараты оценивали на инвертированном световом микроскопе IX81. 2) СЭМ 2/3 роговицы проводилось на электронном микроскопе JSM 6000Plus (JEOL, Япония). Для этого вторые половины роговиц с «+БМ» и «-БМ» трижды отмывали в 1 мл фосфатного буфера (PBS). Затем подвергали дегидратации в ацетоне по следующей схеме:

% ацетона	Время фиксирования
5% раствор ацетона	10 минут
10% раствор ацетона	10 минут
30% раствор ацетона	10 минут
50% раствор ацетона	10 минут
70% раствор ацетона	10 минут
90% раствор ацетона	10 минут
100% ацетон – 3 раза	10 минут

- Полученные дегидратированные образцы двух роговиц помещались в микропористые капсулы CPD800A (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) эпителием вверх. Затем проводили сушку в течение 30 минут в критической точке ($t = 31\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 7,39\text{ МПа}$) в блоке сушки K850 (Quorum Technologies Ltd., Великобритания), в ходе которой ацетон в образцах замещался на жидкий CO_2 .
- По окончании данного этапа образцы роговиц фиксировались на алюминиевых подставках при помощи карбонового скотча и токопроводящего клея эпителием вверх. Далее в вакуумной напылительной установке Smart Coater (Structure Probe, Inc., США) происходило создание электронно-проводящего слоя на поверхности исследуемых роговичных дисков путем напыления 5 нм слоя золота (проба 999).
- После окончания пробоподготовки образцы роговиц обеих групп на алюминиевых подставках помещались в отсек сканирующего электронного микроскопа.
- Затем программным обеспечением активировалось создание следующих условий, в которых проводили изучение микростроения эндотелиальных клеток: высокий вакуум, ускоряющее напряжение 5 кВ.

3) Окраску третьей части роговиц выполняли согласно протоколу ИГХ окрашивания. Подготовленные срезы окрашивали на маркеры: K3, K12, K19, p63, CD90, CD105.

Использовался следующий пошаговый протокол окраски образцов ИГХ:

шаг 1 – инкубация половины роговиц в крио-среде в течение 20 минут при $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ для удаления избыточной влаги;

шаг 2 – замораживание образцов в криостате, выполнение криосрезов 5 мкм и помещение их на предметное стекло.

шаг 3 – отмывание криосрезов от фиксатора раствором фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4) трехкратно по 5 минут при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$;

шаг 4 – пермеабиллизация клеточных мембран 0,3% раствором тритона X-100 в PBS в течение 15 минут при температуре 25 °С;

шаг 5 – отмывание от раствора тритона X-100 раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25 °С;

шаг 6 – инкубирование образцов в блокирующем растворе (1% бычий альбумин и 0,1% Tween 20 разведённые в фосфатно-солевом буфере) для снижения уровня неспецифического связывания антител в течение 1 часа при температуре 25 °С;

шаг 7 – окрашивание клеток первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе, в течение 16 ч при температуре 4 °С. Для выявления экспрессии маркеров использовали первичные антитела в определённом разведении: K3 (1:50), K12 (1:100), K19 (1:100), p63 (1:300), CD 90 (1:100), CD 105 (1:200).

На контрольные срезы первичные антитела не добавляли, а использовали тот же объем блокирующего раствора.;

шаг 8 – отмывание от первичных антител раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25 °С;

шаг 9 – окрашивание образцов вторичными антителами, разведенными в блокирующем растворе, в темноте в течение 1 ч при температуре 25 °С. Для выявления первичных антител, связавшихся с эпитопом на шаге 6, использовали вторичные антитела Alexa Fluor 488 или 594 (1:250), конъюгированные с флуорохромным красителем в соответствии с антигенной принадлежностью первичного (кролик или мышь), которые добавляли на все образцы.

шаг 10 – отмывание от раствора с вторичными антителами раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25 °С;

шаг 11 – окрашивание ядер клеток бис-бензидимом (Hoechst 33258) в концентрации 0,1 мг/мл в растворе PBS в течение 10 минут при температуре 25 °С;

шаг 12 – монтирование срезов под покровное стекло с помощью среды для заключения гистологических препаратов;

шаг 13 – хранение готовых препаратов ИЦ до выполнения лазерной сканирующей конфокальной микроскопии при 4 °С не более 48 часов.

Таблица №3 – Список лабораторного оборудования

Оборудование	Производитель
Ламинарный бокс I класса безопасности Fotron L-F	Pokrok výrobné družstvo Žilina, Чехия
Ламинарный бокс II класса безопасности MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Германия
Центрифуга SL-40R	Thermo Fisher Scientific, Германия
Центрифуга LMC-3000	Biosan, Латвия
Термошейкер TS-100	Biosan, Латвия
Микроцентрифуга-вортекс FV-2400	Biosan, Латвия
Инкубатор NU-5510	NuAire, США
Автоматический счётчик клеток Luna II	Logos biosystems, Корея
Инвертированный световой микроскоп IX-81	Olympus, Япония
Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп FV-10i	Olympus, Япония
Микротом-криостат HM525 NX	Thermo Fisher Scientific, Германия
Морозильная камера -80°C MedRef UF 455 G	B. Medical Systems S.a.r.l., Люксембург
Система очистки воды DirectQ5	Millipore, Германия

Таблица №4 – Список реактивов и лабораторной посуды для культивирования клеток

Реактив	Каталожный номер	Производитель
Раствор для хранения роговицы	-	НЭП МГ, Россия

Аккутаза, фермент	A1110501	Gibco, США
Культуральная среда DMEM-F12	D6421	Sigma Aldrich, США
Культуральная среда EpiLife	MEPICFPRF500	Gibco, США
Глутамин-аланин	35050061	Gibco, США
Смесь антибиотиков (пенициллин 10000 МЕ/мл, стрептомицин 10000 мкг/мл, амфотерицин 25 мкг/мл)	A5955	Sigma Aldrich, США
Фетальная бычья сыворотка	SH30109.03	HyClone Laboratories, США
Инсулин растворимый человеческий генно-инженерный короткого действия	Хумулин Регуляр	Эли Лилли энд Компани, США
Гидрокортизон, суспензия	-	Фармак, Украина
Человеческий рекомбинантный эпидермальный фактор роста	ФР-08000	Панэко, Россия
Чашки Петри 35 мм	430165	Corning, США
4-луночные слайд-флаконы для иммуноцитохимии	30104	SPL Life Sciences, Корея
6-луночный планшет	30006	SPL Life Sciences, Корея
Центрифужные пробирки 15 мл	430791	Corning, США
Центрифужные микропробирки 1,5 мл с плоской крышкой	MCTB015	GenFollower, Китай
Слайды для счётчиков клеток одноразовые	L12003	Logos biosystems, Корея

Таблица – 5 Список реактивов и расходных материалов для иммуноцито- и иммуногистохимических исследований

Реактив	Каталожный номер	Производитель
Фосфатно-солевой буфер	B-60201	ПанЭко, России

Раствор формалина (10%, нейтральный)	R-001/5.000	Лабико, Россия
Тритон X-100	A4975	AppliChem, Германия
Сапонин	SAPO.0100	Диаэм, Россия
Среда для заключения гистологических и цитологических препаратов	12-001	Биовитрум, Россия
Стекло покровное 0,13 мм	BB018024A1	GERHARD MENZEL BV & CO.KG, Германия
Стекло предметное	J1800AMNZ	GERHARD MENZEL BV & CO.KG, Германия
Среда для замораживания гистологических препаратов (Neg-50)	6502	Thermo Fisher Scientific, Германия
Ядерный краситель бисБензимида (Hoechst 33258)	O150	ПанЭко, России

Таблица – 6 Список первичных и вторичных антител, использованных для окраски клеток и тканей

Антитело	Каталожный номер*	Видовая принадлежность и тип	Характеристика
Кератин 3	ab68260	мышинное моноклональное	неороговевающий роговичный эпителий
Кератин 7	ab216016	мышинное моноклональное	эпителий конъюнктивы
Кератин 12	ab185627	кроличье моноклональное	неороговевающий роговичный эпителий
Кератин 19	ab9221	мышинное моноклональное	базальные клетки эпителия

Виментин	ab8978	мышинное моноклональное	промежуточные филаменты
Коннексин 43	ab11370	кроличье поликлональное	щелевидные контакты
ZO-1	ab216880	кроличье поликлональное	плотные межклеточные контакты
CD 29 (Integrin b1)	ab52971	кроличье поликлональное	базальные клетки эпителия
CD 90	ab23894	мышинное моноклональное	Л-МСК
CD 105	ab11414	мышинное моноклональное	Л-МСК
p63	ab124762	кроличье моноклональное	пролиферация
Ki67	ab16667	кроличье моноклональное	пролиферация
ABCG2	ab3380	мышинное моноклональное	ЛЭСК, пролиферация
Alexa Fluor 488	ab150077	козье против кролика	вторичное антитело с флюоресцентной меткой
Alexa Fluor 594	ab150116	козье против мыши	вторичное антитело флюоресцентной меткой

*- все антитела производства Abscam (Великобритания).

2.2. Материалы и методы клинической части исследования

2.2.1. Общая характеристика клинической группы

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Наличие здорового глаза донора.
2. Перенесенный односторонний ожог глаза различной этиологии или кератит в стадии ремиссии.

3. СЛН, подтвержденный биомикроскопически, инструментально и цитологически (в труднодиагностируемых случаях), по нескольким следующим критериям:

- конъюнктивализация поверхности роговицы с неоваскуляризацией;
- наличие специфических паттернов СЛН при окрашивании глазной поверхности нмФЛ;
- рецидивирующая или стойкая эрозия роговицы;
- наличие позитивной экспрессии специфических конъюнктивальных К7/19 на поверхности роговицы по результатам цитологического исследования мазков-отпечатков;
- отсутствие видимых палисад Вогта в зоне лимба.

4. Отсутствие тяжелой соматической патологии и хронических инфекций (отрицательные результаты серологические исследования на гемотрансмиссивные инфекции).

Критерии исключения (общие):

1. Иммуноопосредованный двухсторонний СЛН (синдром Стивенса-Джонсона, глазной рубцующий пемфигоид и др.), СЛН неизвестной или наследственной этиологии (врожденная аниридия и др.);
2. Беременность и/или кормление грудью;
3. Упоминание в анамнезе аллергических реакций на антибиотики, глюкокортикостероиды, средства для коррекции синдрома сухого глаза, препараты местной и общей анестезии;
4. Прием системной иммуносупрессивной терапии;
5. Диагностированный неопластический процесс или лечение по поводу опухолевого заболевания;
6. Положительный результат при тестировании на инфекции: ВИЧ, сифилис, Гепатит В, Гепатит С;

7. Какие-либо медицинские, психиатрические заболевания и/или состояния включая истощение, а также социальные условия, которые, по мнению исследователей, могут мешать пред- и послеоперационному наблюдению или служить противопоказанием для соблюдения протокола исследования или способности дать информированное согласие.

Критерии исключения пациентов (офтальмологические):

1. Ожоговая травма или перенесенный кератит давностью менее 12 месяцев;
2. Кератопластика давностью менее 12 месяцев;
3. Кератопротез на глазу-реципиенте;
4. Клеточная терапия с целью лечения СЛН;
5. Активная инфекция на каком-либо глазу;
6. Эктропион, трихиаз, лагофтальм и/или другие аномалии век и/или сводов конъюнктивы;
7. Перфорация роговицы или толщина менее 100 мкм;
8. Выраженный синдром сухого глаза (тест Ширмера I менее 5 мм) и/или кератинизированная глазная поверхность;
9. Неконтролируемая глаукома и/или наличие дренажного устройства;
10. Нефункциональная сетчатка (отсутствие светоощущения и/или отслойка);

Исследуемая группа пациентов (n=24) была распределена исходя из пола, сопутствующей патологии и предшествующим операциям, этиологии возникновения СЛН, характеристики типа СЛН - неполный или полный, (определяемый по наличию или отсутствию участка неизмененного эпителия) и стадиям заболевания согласно Глобальному консенсусу (Deng, 2019) (Рисунок 7);

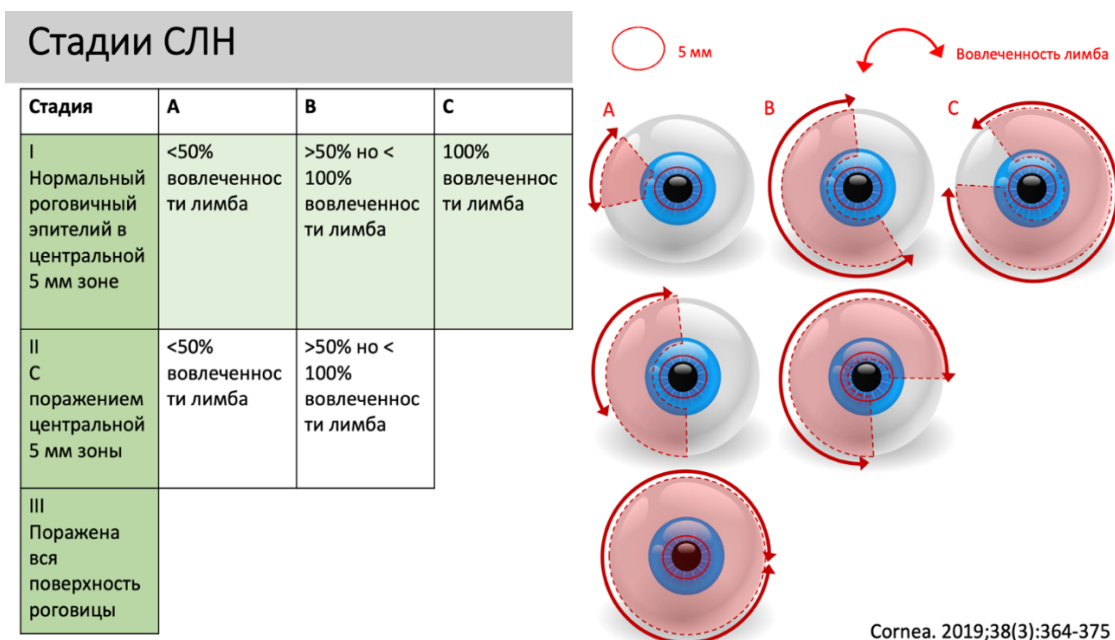


Рисунок 7 – Характеристика СЛН по стадиям.

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 (фотография окрашенной роговицы пациента) в процентном соотношении исходя из значений площади конъюнктивализации в пределах роговицы/площадь роговицы в свободно распространяемой программе Fiji (ImageJ 2.0.0-rc69/1.52) (Schindelin J., 2012) с использованием базовых инструментов путём ручного выделения диаметра роговицы и границ неизмененного эпителия (рисунок 8, таблица 7).

Сомнительный исход лечения – рецидив частичной конъюнктивализации и неоваскуляризации роговицы, не затрагивающие центральной 5 мм зоны роговицы, окрашивание эпителия.

Неблагоприятный исход лечения – рецидив фиброваскулярного паннуса, вторгающегося в оптическую зону, рецидив(-ы) эрозии роговицы

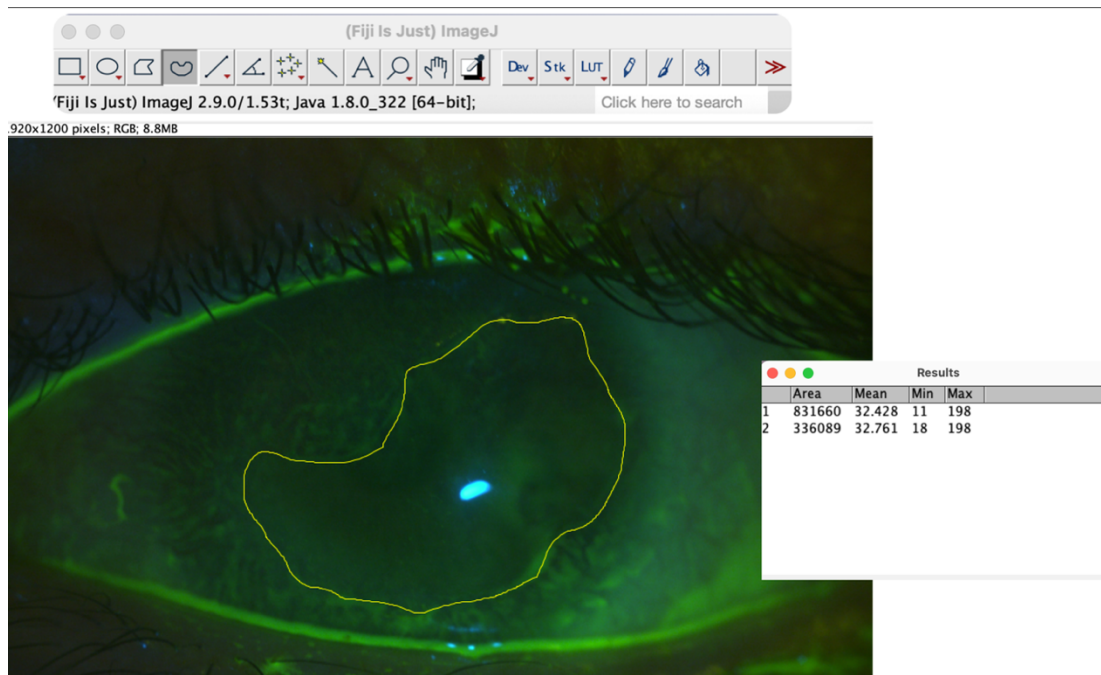


Рисунок 8 – Пример определения площади неизменного эпителия роговицы с помощью программы Fiji: ImageJ ручным методом. В данном случае площадь конъюнктивализации составила 59,6%.

Таблица 7 – Критерии успеха и неудачи у пациентов после G-SLET

Критерии	Благоприятный исход лечения	Сомнительный исход лечения	Неблагоприятный исход лечения
Объективное обследование	Отсутствие персистирующей эрозии	Наличие более 1 критерия “неблагоприятного исхода” с 1 и более критериями “благоприятного исхода”	Наличие персистирующей эрозии
	Отсутствие конъюнктивализации и неоваскуляризации в центральной части роговицы и на периферии		Наличие конъюнктивализации и неоваскуляризации в центральной части роговицы и на периферии
Изменение площади здорового эпителия при окрашивании	Преобладание роговичного эпителия в центральной части роговицы		Преобладание конъюнктивального эпителия в центральной части роговицы

нмФЛ, ОКТ переднего отрезка			
Таблица Сивцева- Головина (децимальные величины)	Повышение остроты зрения		Снижение остроты зрения

*НКОЗ и МКОЗ измерялось в десятичных значениях специально обученным оптометристом. Для пациентов с низкой остротой зрения использовали десятичные эквиваленты: светоощущение – 0,001, движение руки у лица – 0,002, счет пальцев у лица – 0,004 (Inatomi, 2006).

Вторичный критерий эффективности

Система балльной оценки состояния роговицы, описанная Campbell и соавт. (2019) была использована для оценки (Таблица 8):

- а) окрашивания эпителия роговицы,
- б) конъюнктивализации,
- в) неоваскуляризации роговицы,
- г) помутнения роговицы при осмотре с помощью щелевой лампы глаза с СЛН.

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. Окрашивание роговицы проводили с использованием тест-полосок с нмФЛ (Fluo® Strips, Contacare Ophthalmic and Diagnostics, Гуджарат, Индия) во время биомикроскопии на щелевой лампе с кобальтовым синим светом и желтым фильтром (BQ 900, Haag-Streit, Берн, Швейцария) (Таблица 9);

Таблица 8 – Система балльной оценки состояния роговицы

Параметр	0 баллов (норма)	1 балл (легкая степень)	2 балла (средняя степень)	3 балла (тяжелая степень)
Окрашивание роговицы	Нет точечного окрашивания	Точечное окрашивание <50%	Точечное окрашивание >50%	Эпителиальный дефект
Неоваскуляризация роговицы	Отсутствует	Ограничена периферией роговицы	До края зрачка	На оптической оси
Конъюнктивализация роговицы	Отсутствует	<25% поверхности роговицы	25-50% поверхности роговицы	>50% поверхности роговицы
Помутнение роговицы	Прозрачная, детали радужки визуализируются без затруднений	Детали радужки частично не визуализируются	Детали радужки видны плохо, виден только край зрачка	Детали радужки и зрачок не визуализируются

Адаптировано по J.D.M. Campbell и соавт., 2019 [Allogeneic Ex Vivo Expanded Corneal Epithelial Stem Cell Transplantation: A Randomized Controlled Clinical Trial. STEM CELLS Translational Medicine.2019;8:323-331].

2.2.2. Клинико-функциональные показатели пациентов в предоперационном периоде

Все пациенты, вошедшие в исследование (n=24), первично прошли комплекс базовых клинико-функциональных методов офтальмологической диагностики, осмотрены врачом первичного приёма и направлены в отдел трансплантационной или оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глаза с целью определения тактики дальнейшего лечения. Часть пациентов (n=5) была направлена в отделение окулопластики для проведения первых этапов лечения: реконструкции сводов век, устранения симблефарона

и трихиаза и т.д. Характеристика пациентов до операции представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Дооперационная характеристика пациентов по полу, возрасту, сопутствующей патологии, этиологии, типу и стадии СЛН.

Параметр	Количество	
	Абс.	%
Количество пациентов	24	100,0
Из них		
Мужчины	12	50,0
Женщины	12	50,0
Количество глаз	24	100,0
Возраст, лет (Me (Q1; Q3))	32,5 (25,5; 38,5)	-
Сопутствующая патология и предшествующие операции		
Катаракта	7	29,2
СКП	3	12,5
Реконструкция сводов	5	20,8
Афакия	1	4,2
Этиология СЛН		
Щелочной ожог	9	37,5
Кислотный ожог	8	33,3
Спиртовой ожог	4	16,7
Термический ожог	2	8,3
Кератит	1	4,2
Тип СЛН		
Полный	15	62,5
Неполный	9	37,5
Давность травмы, мес (Me (Q1; Q3))	60 (18; 144)	-
Стадия СЛН		
1	2	8,3
2	7	29,2
3	15	62,5

По итогам клинико-функциональных показателей пациентов в предоперационном периоде (n=24): соотношение по полу мужчины и женщины составило 50%, у большинства пациентов этиологией повреждения роговицы явился щелочной ожог роговицы n=9 (37,5%). Полный СЛН, и соответственно, 3 стадия заболевания наблюдались у 15 пациентов и составила 62,5% от общего числа.

2.2.3. Методы клинико-функциональных исследований

Всем пациентам, включенным в исследование, было проведено до- и послеоперационное офтальмологическое обследование. Помимо **стандартных методов исследования** (биомикроскопия, визометрия, авторефрактометрия, В-сканирование электрофизиологическое исследование, тонометрия) оно включало **дополнительные методы исследования**: фоторегистрация роговицы с оценкой глазной поверхности, при обычном освещении и в кобальтовом синем свете с предварительным окрашиванием тест-полоской нмФС, ОКТ переднего отрезка глазного яблока, в некоторых случаях выполняли ОКТА и ЛСКМ роговицы. В затруднительных случаях постановки диагноза использовали методику ИЦ с ИГХ.

Стандартные офтальмологические исследования

1. *Биомикроскопию переднего отрезка глаза* проводили с использованием щелевой лампы модели SL-30 фирмы «Opton» (Германия). Перед операцией оценивали поврежденный глаз-реципиент: состояние век, тарзальной и бульбарной конъюнктивы (лагофтальм, симблефарон, деформации сводов) и ресниц (трихиаз). Затем оценивали состояние глазной поверхности (наличие участков неповрежденного эпителия, протяженность конъюнктивализации роговицы, наличие помутнений, эрозий и неоваскуляризации роговицы, визуализацию и состояние лимбальных крипт). После операции оценивали качество ре-эпитализации роговицы/трансплантата, состоятельность швов, визуализировали

лимбальные аутотрансплантаты на периферии роговицы. На здоровом глазу-доноре оценивали наличие полной эпителизации и отсутствие любых повреждений роговицы, проводили детальный осмотр лимба по всей периферии роговицы (для оценки целостности и состояния лимбальных крипт). После операции - адаптированность места биопсии на верхнем лимбе, состоятельность швов, отсутствие воспаления.

2. **Визометрию** проводили с использованием проектора опто типов SZP 350 Zeiss (Германия) и набора очковых линз (MSD, Италия), в стандартных условиях, для достижения максимальной коррекции линзы подбирали эмпирически.

3. **Авторефрактометрию** выполняли на аппарате RC-5000 (Tomey, Япония) в естественных условиях, погрешность измерения прибора составляет $\pm 0,25$ дптр.

4. **Ультразвуковое исследование В-сканирование** проводили до оперативного вмешательства на аппарате UD-6000 (Tomey, Япония) в ходе исследования исключали наличие гемофтальма, отслойки сетчатки, внутриглазных образований.

5. **Электрофизиологические методы исследования** проводили для оценки функционального состояния сетчатки и зрительного нерва до операции использовали определение порога электрической чувствительности, лабильности зрительного нерва и критической частоты слияния мельканий.

6. **Тонometriю** выполняли на пневмотонометре Горсон (Япония) и контактным методом с помощью аппланационного тонометра Маклакова под местной анестезией раствором пропаракаина гидрохлорида. При необходимости проводили тонографию.

Дополнительные методы исследования

1. **Окраска роговицы нмФЛ** использовали тест-полоски с нмФЛ, предварительно смоченные антисептиком, затем дотрагивались до нижнего слезного мениска, после чего просили пациента поморгать, и с помощью

щелевой лампы при фокальном освещении в синем кобальтовом свете оценивали степень конъюнктивализации, размер и локализацию эпителиального дефекта (при наличии). В послеоперационном периоде исследование проводили через 2 недели, далее на сроках 1, 3, 6, 12 месяцев.

2. **ОКТ переднего отрезка** выполняли с помощью томографа Avanti xR (Optovue Inc. Fremont, California, USA). Исследование выполняли в режимах Line, Cross-Line, Pachymetry and PachymetryWide а также режиме ОКТ-Ангио с использованием программы AngioVue и алгоритма SSADA. Оценивали эпителиальный слой в до – и послеоперационном периоде на сроках 2 недели, 1 месяц, 3, 6, 12 месяцев (контроль). На пораженном (реципиентном) глазу проводили измерение толщины эпителия и фиброваскулярного паннуса, оценивали состояние стромы (интенсивность и глубина помутнений) и глубжележащих структур (обнаружение иридокорнеальных синехий, ретрокорнеальных мембран). На глазу-доноре производили оценку состоятельности палисад Вогта и лимбальных крипт. При выполнении исследования в режиме «Angio» изучали состояние микроциркуляторного русла роговицы и глубины залегания новообразованных сосудов.

3. **In vivo ЛСКМ** проводили на аппарате IVCM - HRT II с модулем роговицы Rostock (Heidelberg Engineering GmbH, Германия). Оценивали изменения зоны лимба глаза-реципиента на 12 часах (отсутствие или частичное разрушение палисад Вогта и фокальных стромальных проекций), в центральной части роговицы оценивали морфологию эпителиальных клеток (размер, границы, ядра, метаплазия клеток).

4. **Фоторегистрацию глаз пациентов** осуществляли при помощи фотощелевой лампы Haag-Streit BQ-900 (Швейцария).

5. **Импрессионную цитологию с иммуногистохимическим исследованием** проводили по методике, описанной в главе IV.

2.2.4. 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Целью данной главы явилось экспериментальное изучение роста, фено- и иммуно-фенотипа культивированных клеток: 1) в группе контроля на чашке Петри из лимбальных трансплантатов на различных культуральных средах; 2) из лимбальных трансплантатов фиксированных в роговичных туннелях на поверхности стромы и БМ кадаверных роговиц; Все представленные исследования были проведены в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (руководитель центра – д.м.н., профессор Борзенко С.А).

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

Морфология первичной культуры клеток из лимбальных трансплантатов.

Первичная культура ЛСК была получена методом культивирования эксплантов лимба в двух культуральных средах: для МСК - DMEM/F12 и эпителия - EpiLife с добавками, которые избирательно стимулируют рост эпителиальных клеток, сроки культивирования составили 21 день (рисунки 9-13).

Выход первичных клеток был зарегистрирован на 7-е сутки от посева что характерно для трупного донорского материала. Клетки распространялись конгломератом по культуральной поверхности от экспланта во все стороны и имели плотные контакты между собой, полигональную форму, крупное ядро, наблюдался более активный рост смешанных и эпителиальных клеток (рисунок 11).

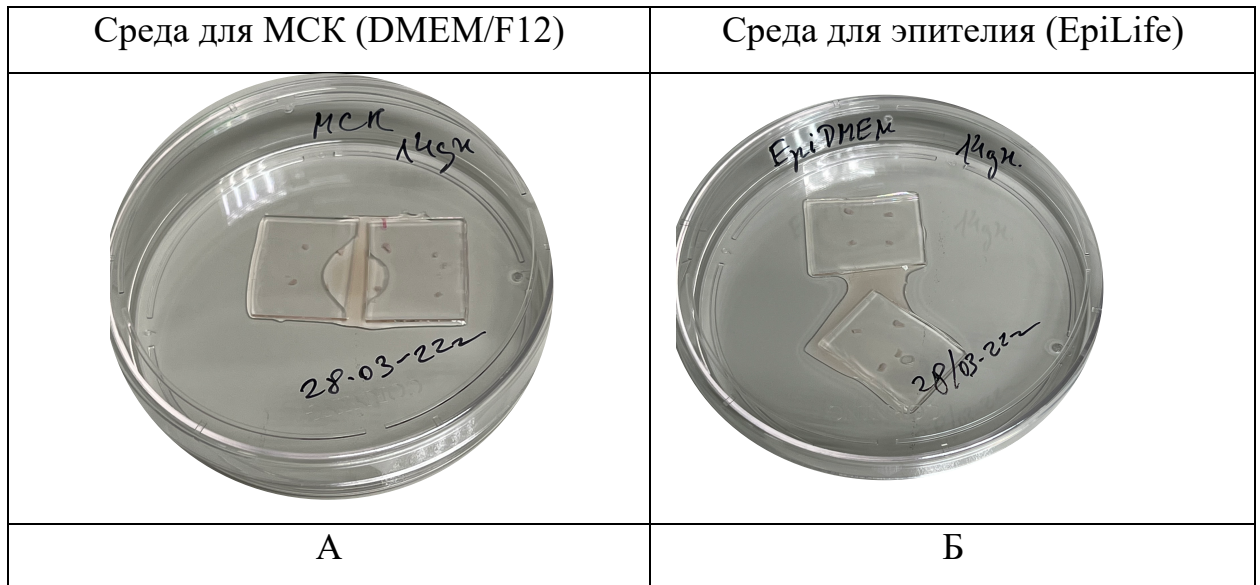


Рисунок 9 – Культура клеток лимба из роговицы. А-Б макросъёмка. Фотографии чашек Петри с эксплантами лимба роговицы в разных культуральных средах, фиксированных к культуральной поверхности стерильным предметным стеклом.

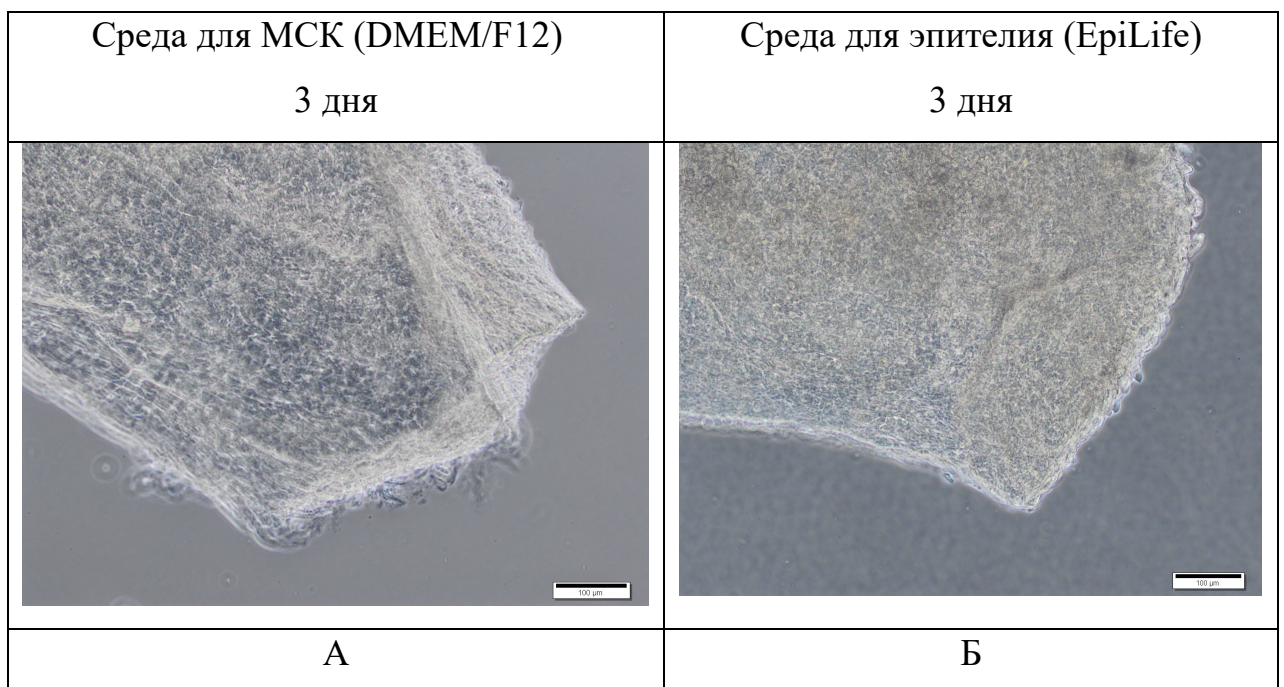


Рисунок 10 –А-Б: Экспланты лимба роговицы без признаков роста. 3-и сутки культивирования. Световая фазово-контрастная микроскопия, А-Б ув. 100х.

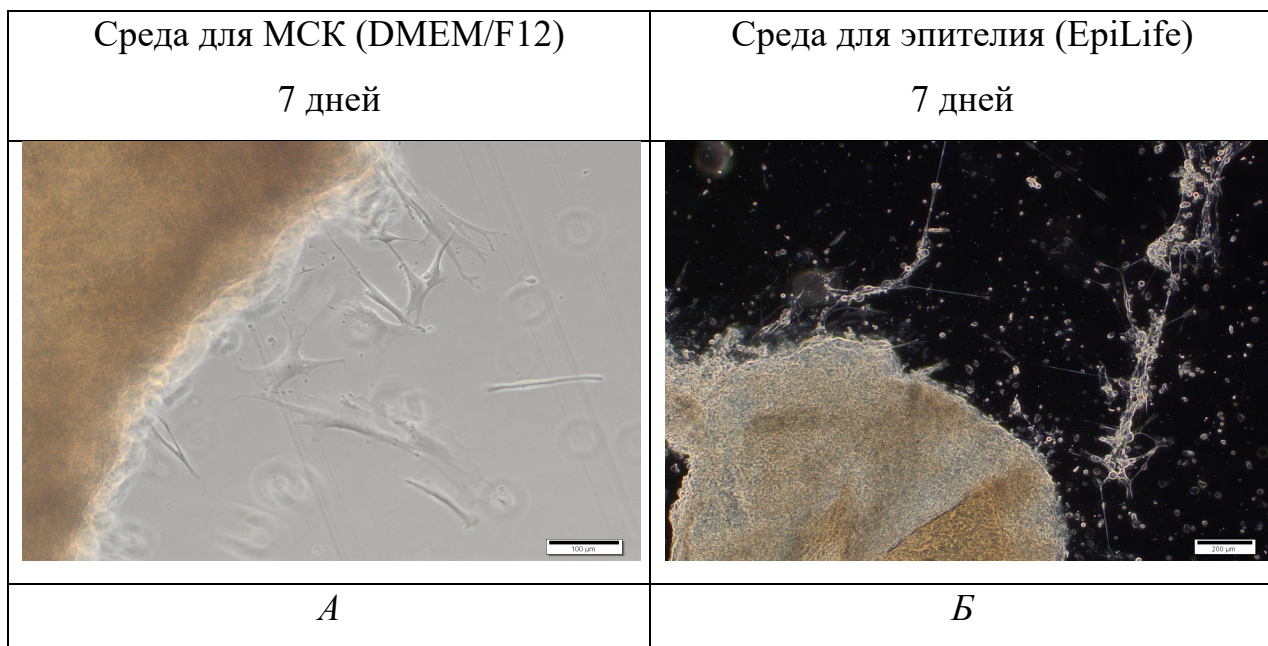


Рисунок 11 – А-Б: Экспланты лимба роговицы на 7-е сутки культивирования. Световая фазово-контрастная микроскопия, А-Б ув. 50х.

На 14 день клетки имели тенденцию к росту и делению на расстоянии от трансплантата, культура клеток имела смешанный характер (рисунок 12).

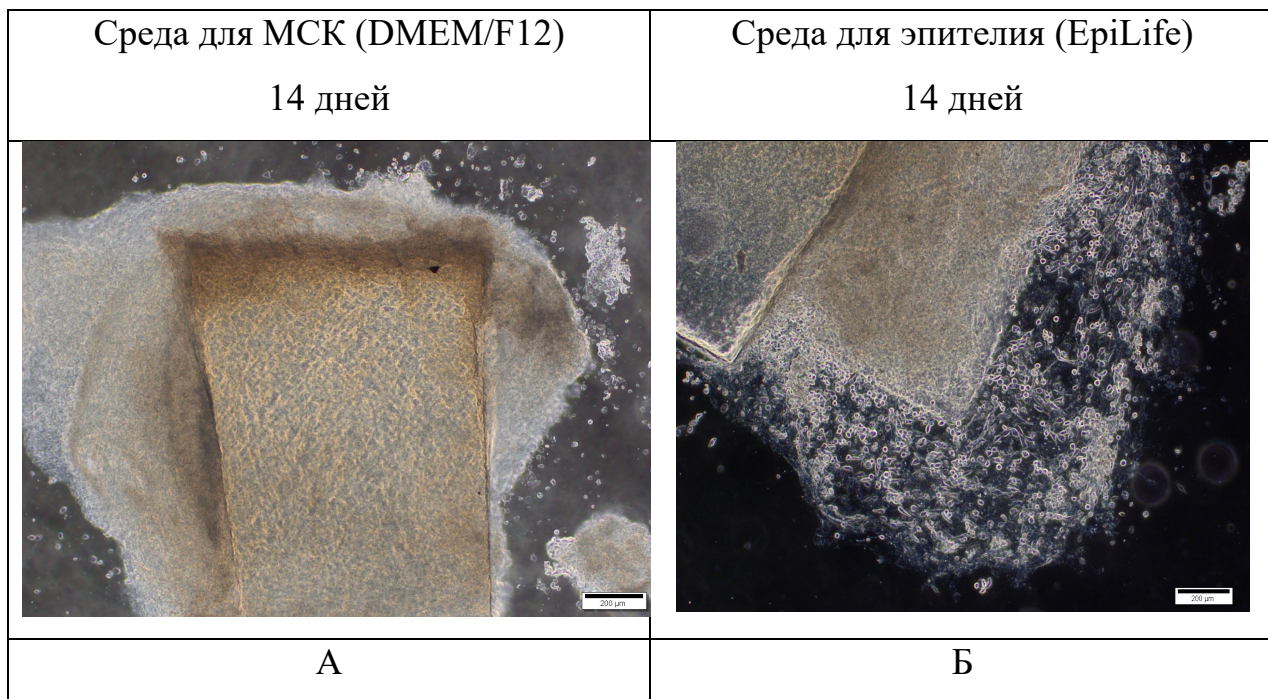


Рисунок 12 – А-Б: Экспланты лимба роговицы на 14 е сутки культивирования. Световая фазово-контрастная микроскопия, А- ув. 100х Б - ув. 50х.

На 21 день рост клеток выявлен в обеих средах, однако в среде EpiLife превалирует рост эпителиальных клеток. Морфология нулевого пассажа культуры клеток из лимба роговицы (рисунок 13).

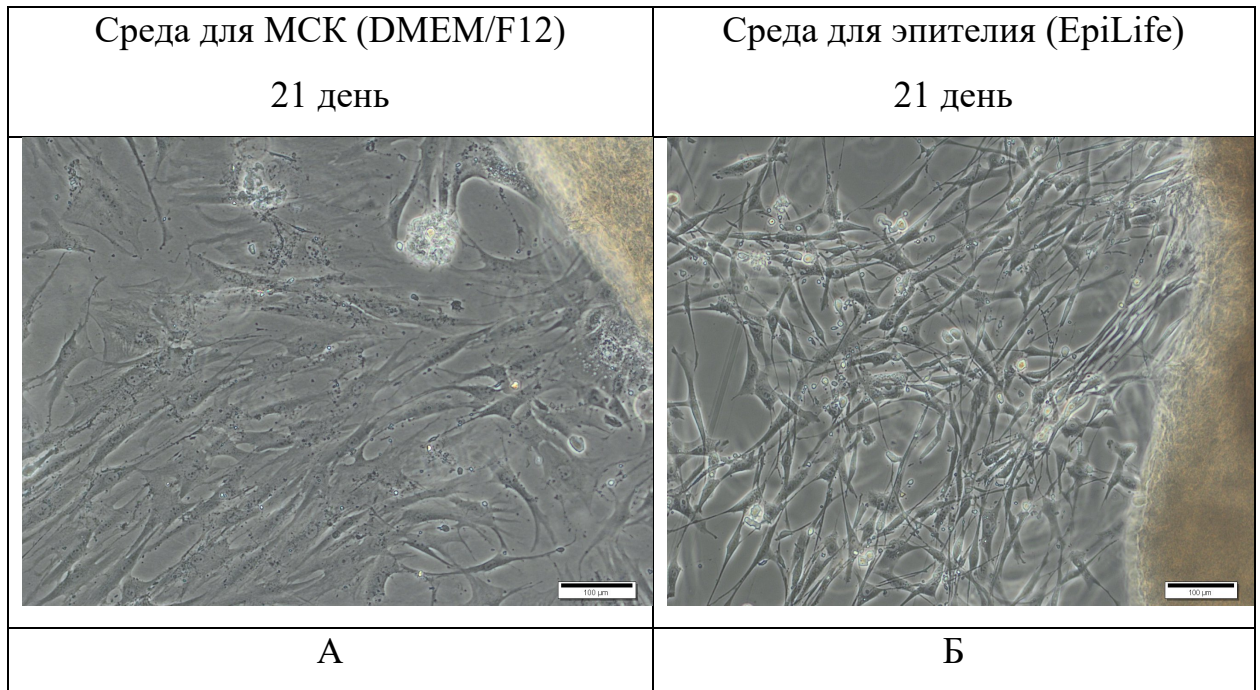


Рисунок 13 – Морфология нулевого пассажа культуры клеток из лимба роговицы на 21 день культивирования. Световая фазово-контрастная микроскопия, А-Б ув. 100х.

Иммуно-фенотип первичной культуры клеток из лимбальных трансплантатов

ИЦХ окрашивание культуры клеток из лимба роговицы выполняли для первого пассажа. Иммуно-фенотип клеток оценивали в двух средах по маркерам: зрелых эпителиальных клеток - К3, К12, К19, интегрин 1b (рисунок 14, 15); маркерам плотных межклеточных контактов (коннексин 43, ZO-1) и маркера перехода эпителия в мезенхимоподобные клетки -виментина (рисунок 16, 17).

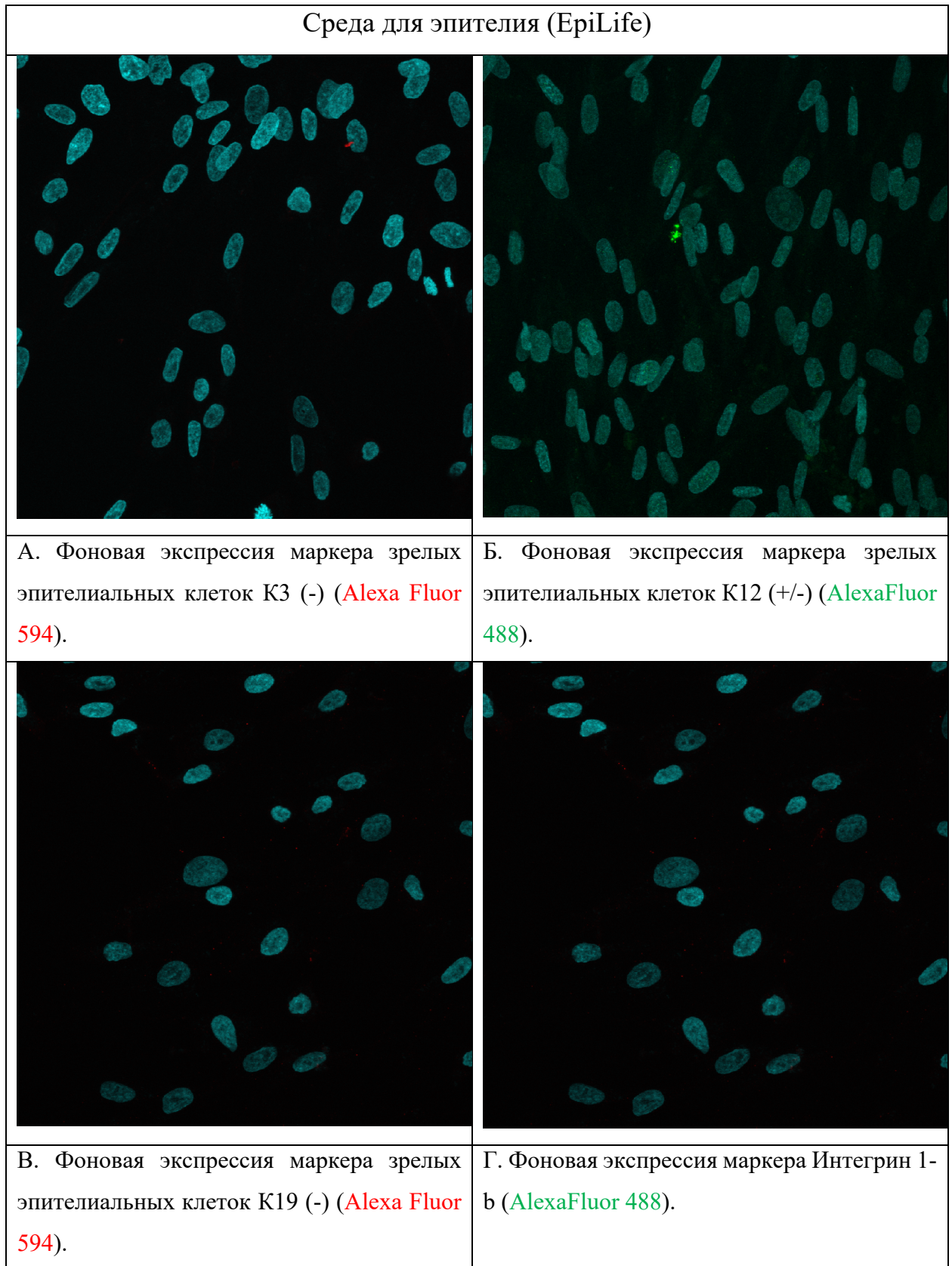


Рисунок 14 – ИЦХ-анализ первого пассажа культуры клеток из лимба роговицы, полученной методом миграции. Группа контроля, культивирование

в среде EpiLife. ИЦХ окрашивание, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимида (*Hoechst 33258*), ув. 600х

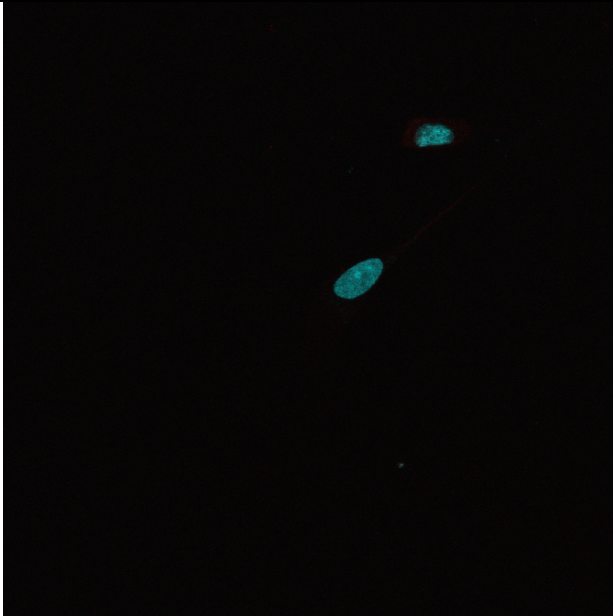
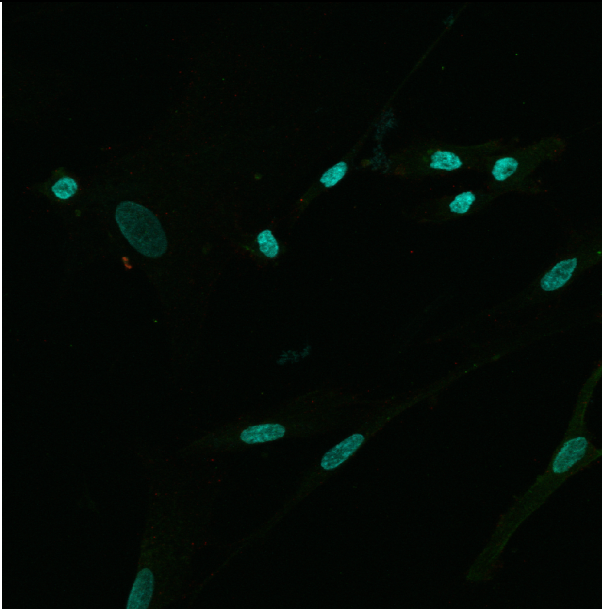
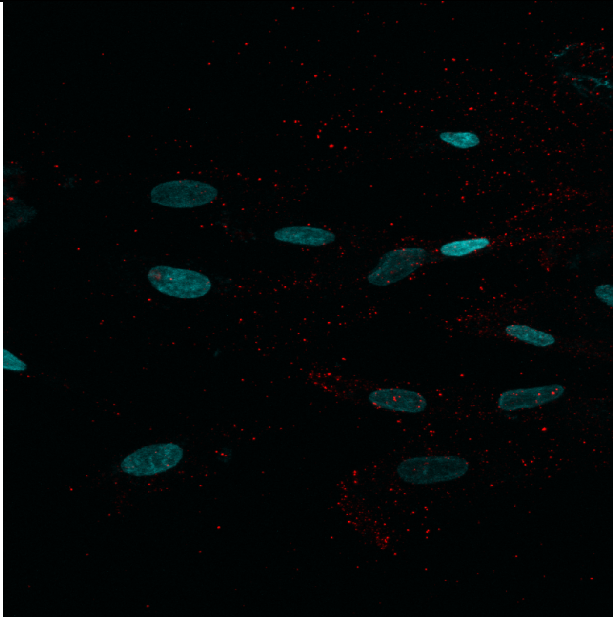
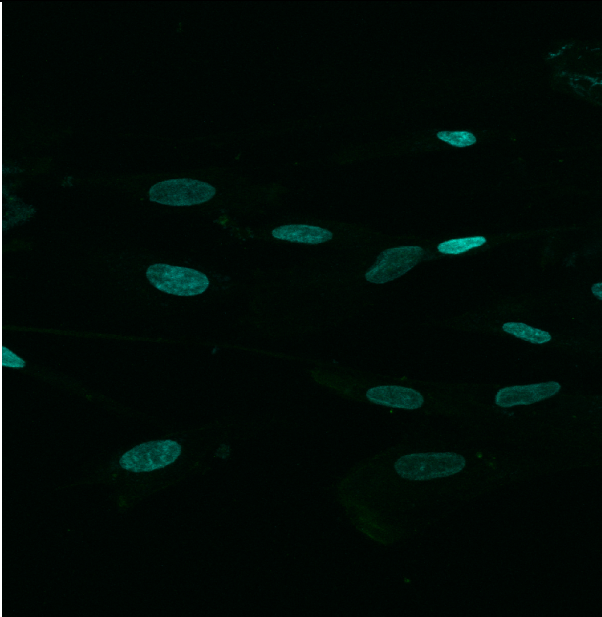
Среда для МСК (DMEM/F12)	
	
А. Фоновая экспрессия маркера зрелых эпителиальных клеток К3 (+/-) (Alexa Fluor 594).	Б. Слабая экспрессия маркера зрелых эпителиальных клеток К12 (+) (AlexaFluor 488).
	
В. Фоновая экспрессия маркера зрелых эпителиальных клеток К19(+/-) (Alexa Fluor 594).	Г. Фоновая экспрессия маркера Интегрин 1-b (-) (AlexaFluor 488).

Рисунок 15 – ИЦХ-анализ первого пассажа культуры клеток из лимба роговицы, полученной методом миграции. Группа контроля, культивирование в среде DMEM/F12. ИЦХ окрашивание, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимида (*Hoechst 33258*), ув. 600х

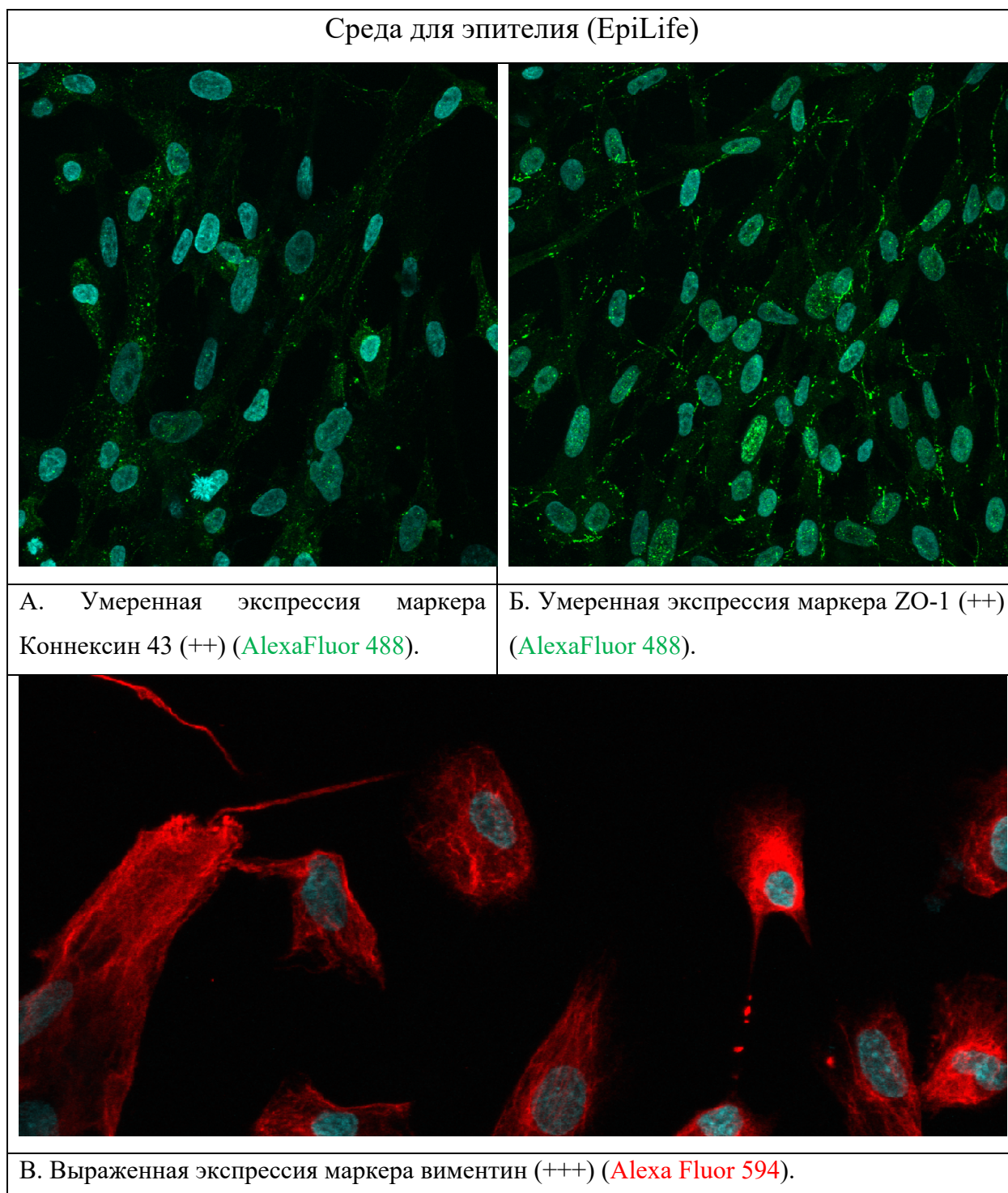


Рисунок 16 – ИЦХ-анализ первого пассажа культуры клеток из лимба роговицы, полученной методом миграции. Группа контроля, культивирование в среде EpiLife. ИЦХ окрашивание, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимида (*Hoechst 33258*), ув. 600х

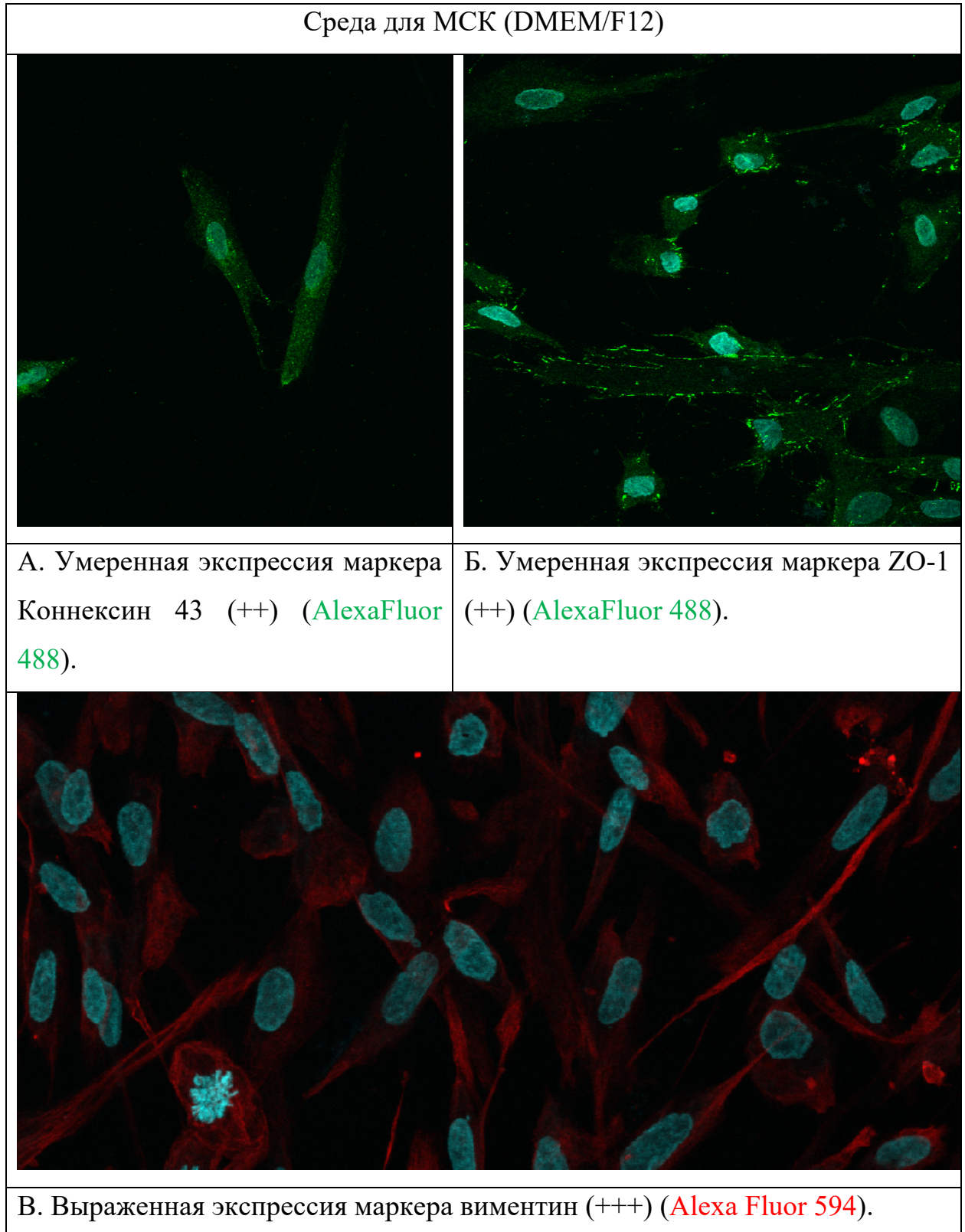


Рисунок 17 – ИЦХ-анализ первого пассажа культуры клеток из лимба роговицы, полученной методом миграции. Группа контроля, культивирование в среде DMEM/F12. ИЦХ окрашивание, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимида (Hoechst 33258), ув. 600x

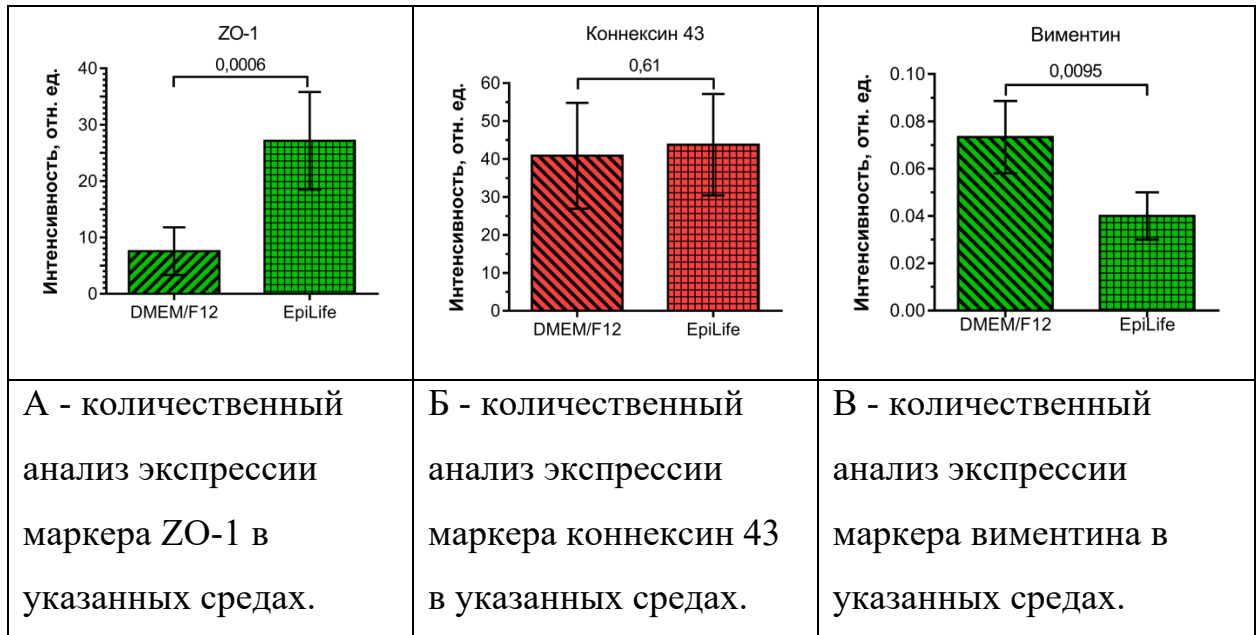
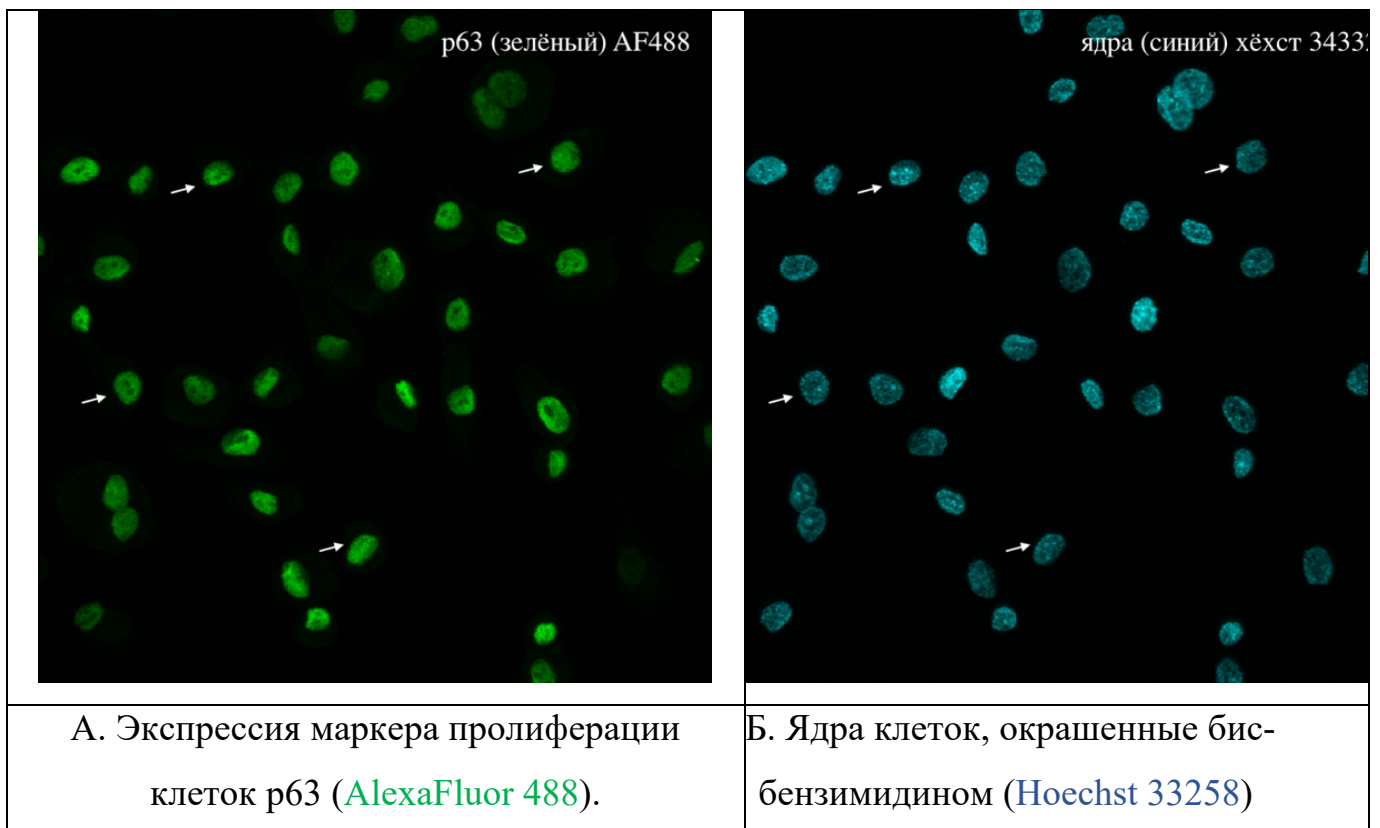


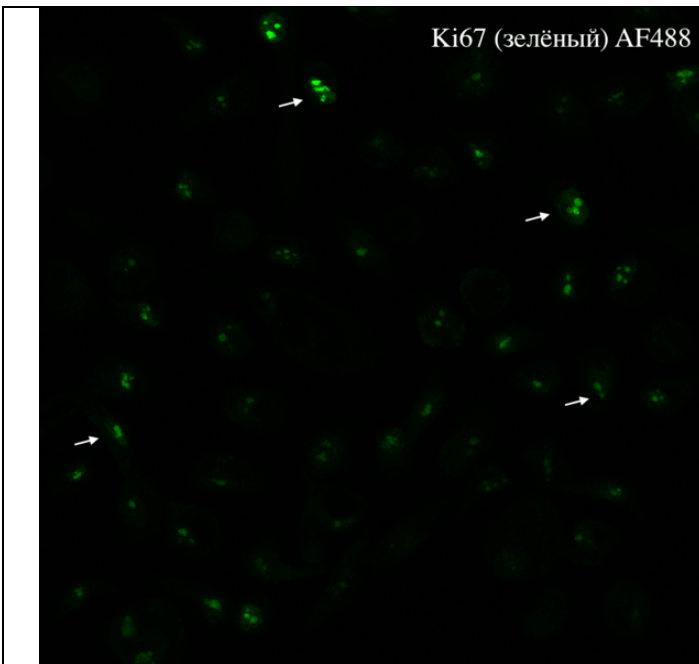
Рисунок 18 – Сравнительный анализ экспрессии маркеров ZO-1, коннексина 43 и виментина по программе CellProfiler в различных средах в первом пассаже культуры клеток из лимба роговицы.

ИЦХ исследование первого пассажа показало, что маркеры зрелых эпителиальных клеток (K3, K12, K19) в среде EpiLife являются отрицательными или слабо положительными в среде для DMEM/F12, интегрин 1b отвечающий за базальные клетки эпителия был также отрицателен в обеих средах (рисунки 14-15). Маркеры плотных межклеточных контактов (коннексин 43 и ZO-1) более характерны для дифференцированных клеток их умеренная экспрессия говорит в пользу высокого содержания недифференцированных ЛЭСК. Согласно программе по подсчету клеток CellProfiler маркер перехода эпителия в мезенхимоподобные клетки - виментин был положителен в обеих средах (рисунки 16-17). Однако в среде DMEM/ F12 указанный маркер имел более

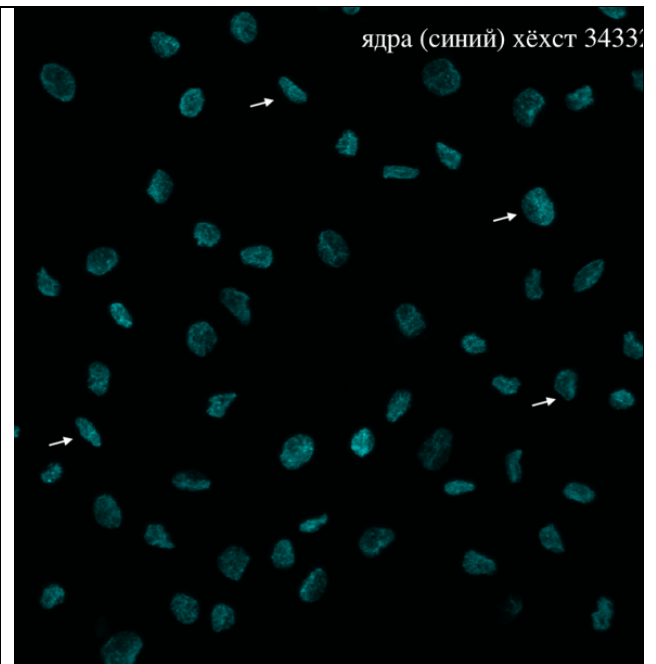
высокую экспрессию, что говорит об эпителиально-мезенхимальном переходе клеток в окрашенном первичном пассаже ЛЭСК (рисунок 18 В). С целью подтверждения сохранности эпителиального фенотипа клеток дальнейшее выполнение ИЦХ, проточной цитофлюориметрии и культивирование донорских роговиц во второй части эксперимента были выполнены в среде для эпителия Epilife (0,06 мМ Са⁺⁺).

По результатам оценки маркеров пролиферативной активности клеток p63, Ki67 и ABCG2 (рисунок 19), последний из которых является специфическим для ЛЭСК [139]. Положительные маркеры Ki 67 и ABCG2 в указанных средах указывают на преимущественный рост и активную пролиферацию незрелых ЛЭСК в среде Epilife (рисунок 19).

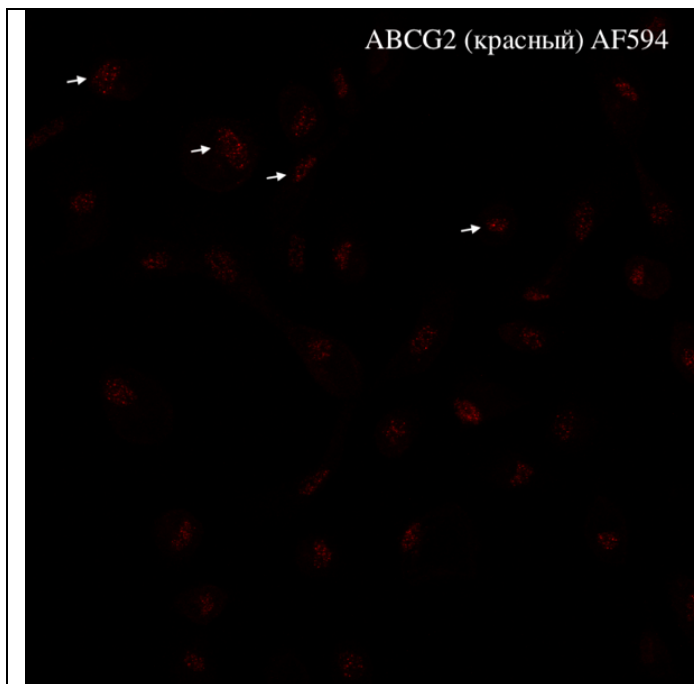




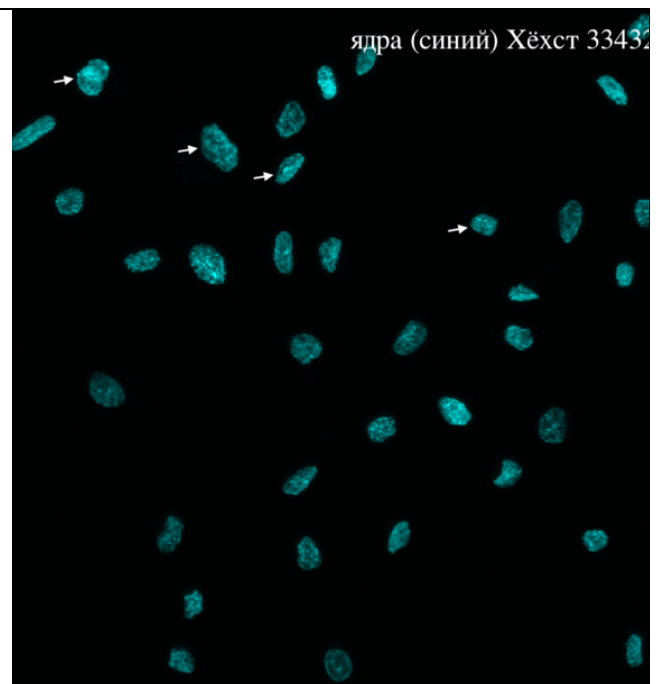
В. Экспрессия маркера пролиферации
клеток Ki67 (**AlexaFluor 488**)



Г. Ядра клеток, окрашенные бис-
бензимидином (**Hoechst 33258**).



Д. Экспрессия маркера пролиферации
клеток ABCG2 (**Alexa Fluor 594**).



Е. Ядра клеток, окрашенные бис-
бензимидином (**Hoechst 33258**).

Рисунок 19 – ИЦХ анализ первого пассажа культуры клеток из лимба роговицы, полученной методом миграции. ИЦХ окрашивание, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимида (*Hoechst 33258*), ув. 600х

Экспрессия указанных маркеров по медиане составила 85,0%, 61,9% и 97,0% соответственно, что характеризует культуру как активную и состоящую из ЛЭСК (таблица 11, рисунок 20). График экспрессии маркеров пролиферации и ЛЭСК в культуре клеток (в %). Крестом обозначена медиана (рисунок 20).

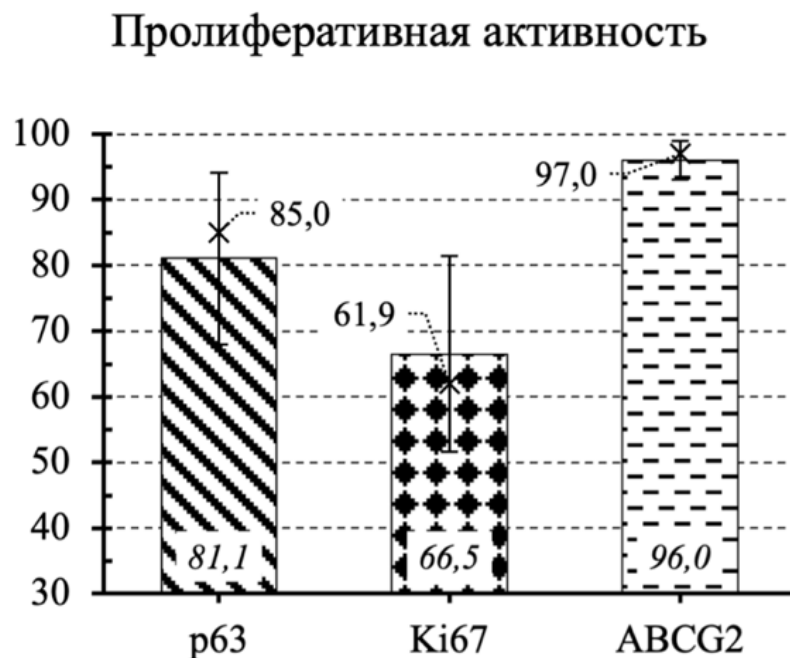


Рисунок 20 – Анализ маркеров пролиферации в первом пассаже культуры клеток из лимба роговицы.

Проточная цитофлуориметрия первичной культуры клеток из лимбальных трансплантатов

Проточная цитофлуориметрия культуры клеток из лимба роговицы была выполнена для первого пассажа. В первую очередь анализировали маркеры, характерные для МСК лимба роговицы: CD 73, 90, 105 (положительные), CD 34 (отрицательный) [21]. В то же время оценивали

экспрессию маркера CD 29 (или интегрина $\beta 1$) характерного для эпителиальных клеток, и общий профиль положительных и отрицательных маркеров для сравнения с классическим профилем МСК и ЛЭСК по данным нескольких исследований [21, 136, 51].

По результатам анализа были отмечены высокое содержание клеток, экспрессирующих CD 73, 90, 105, а также CD 29 (интегрин $\beta 1$) (рисунок 21). Это говорит о том, что первый пассаж клеток имеет высокий потенциал для пролиферации, высокий уровень стволовости и выраженную экспрессию маркера эпителиальных клеток CD 29 (таблица 10, рисунок 21). Маркер CD 34 не экспрессировался, что характерно как для МСК, так и для ЛЭСК (рисунок 21).

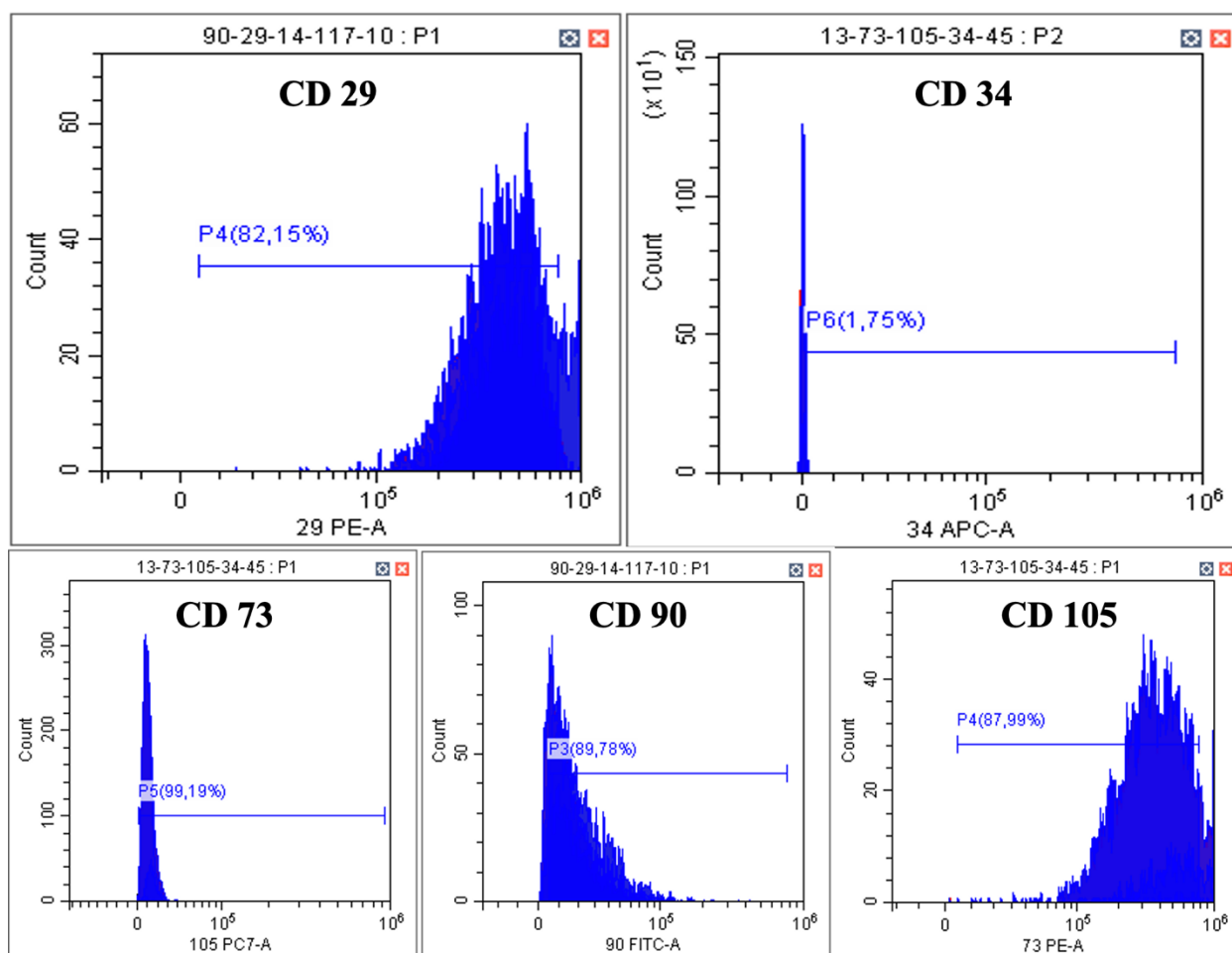


Рисунок 21 – Графики экспрессии маркеров CD в суспензии клеток в первом пассаже культуры клеток из лимба роговицы. Проточная цитофлуориметрия.

Таблица 10 – Показатели экспрессии маркеров в культуре клеток из лимба роговицы, полученной методом миграции.

Маркер	Статистические показатели			Относительный уровень экспрессии
	среднее (%)	медиана (%)	ст. откл.	
p63	81,1	85,0	13,1	++
Ki67	66,5	61,9	15,0	+++
ABCG2	96,0	97,0	2,9	++
интегрин β 1	-	-	-	+++
коннексин 43	-	-	-	+++
ZO-1	-	-	-	++
виментин	0,005*	0,005*	0,001*	+
CD 29	82,2	-	-	+++
CD 34	1,75	-	-	0
CD 73	88,0	-	-	+++
CD 90	89,8	-	-	+++
CD 105	99,2	-	-	+++

Обозначения: уровни экспрессии (AF488 и AF594): “+++” – выраженная, “++” – умеренная, “+” – слабо-положительно, “0” – нулевая или сравнимая с фоновой. * – относительные единицы.

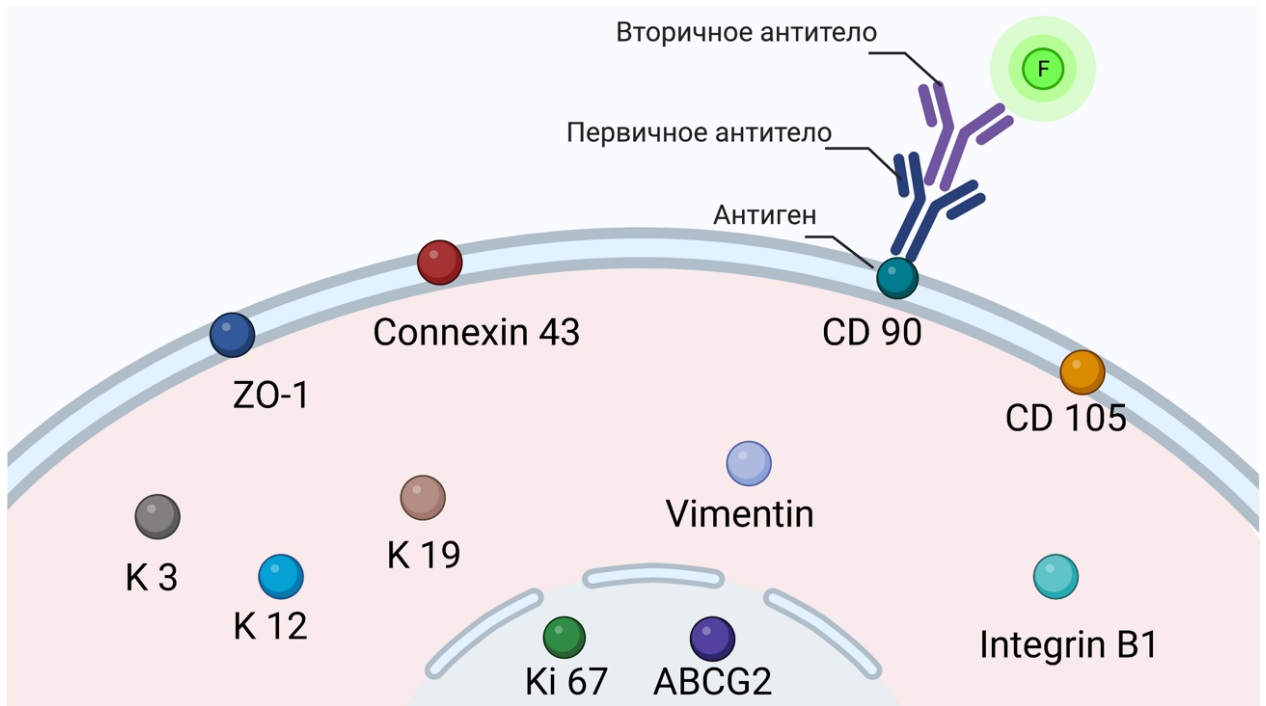


Рисунок 22 – Схема расположения маркеров в ЛСК.

Таким образом, контрольное культивирование лимбальных трансплантатов (21 день) в различных средах, применяемых преимущественно для эпителиальных - EpiLife и для мезенхимальных клеток - 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). 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.

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

Результаты гистологического исследования 1/3 роговицы с «БМ+».

В обоих образцах роговиц с сохраненной БМ трансплантаты были расположены в роговичном туннеле и частично выступали на переднюю поверхность роговицы (Рисунок 233, А-Б). В диастазе между трансплантатами и стенкой сформированного интрастромального туннеля имелась пролиферация новообразованного эпителия, распространяющийся по обе стороны от туннеля (Рисунок 23, Б-Г). Отмечено, что клетки свободно выходят из туннеля и распространяются по поверхности БМ в 1-2 слоя с переходом через срез стромы на противоположную сторону, среди клеток отчетливо виден базальный слой и 1-2 последующих ряда (с правильной вертикальной стратификацией) (Рисунок 23, В).

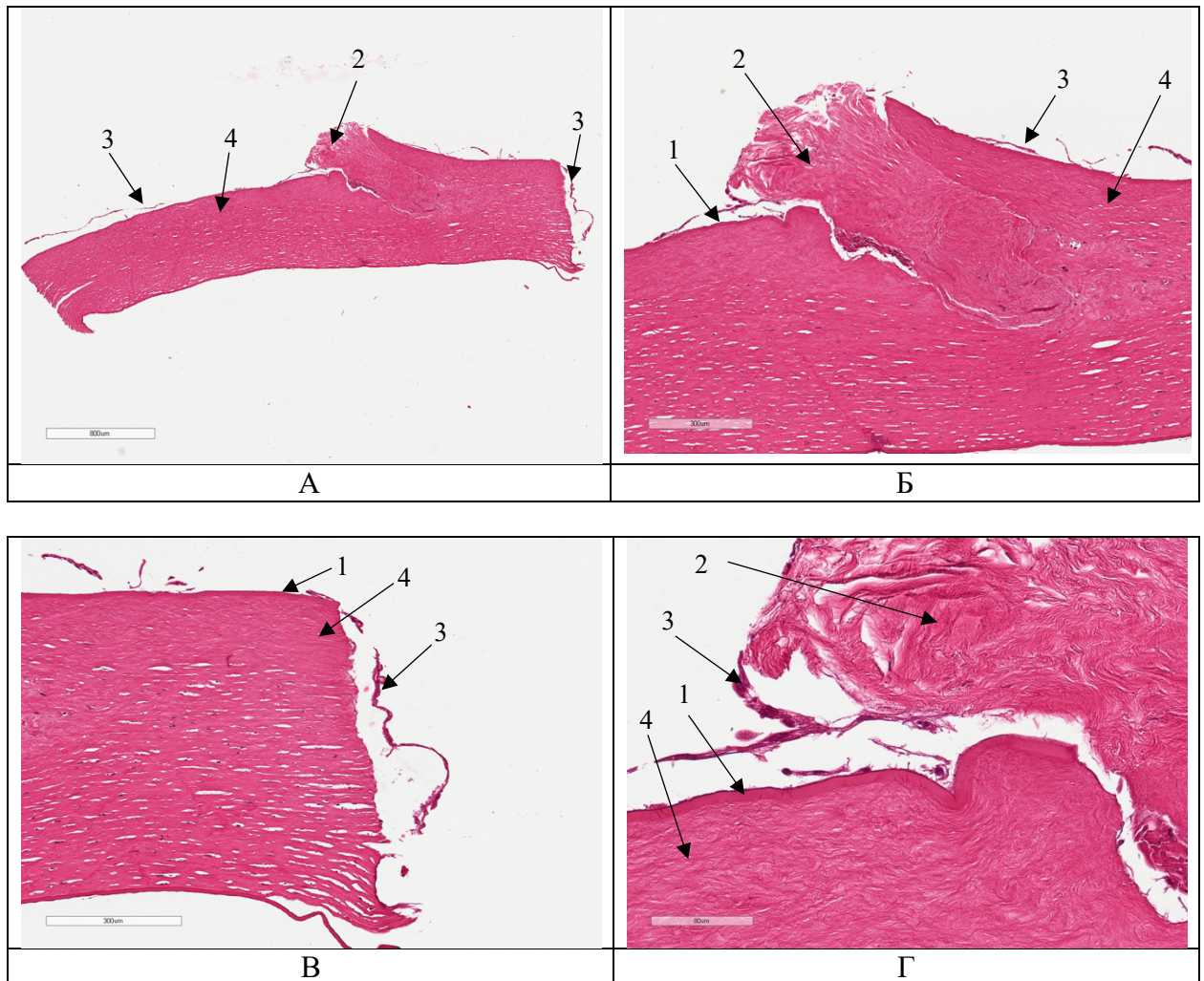
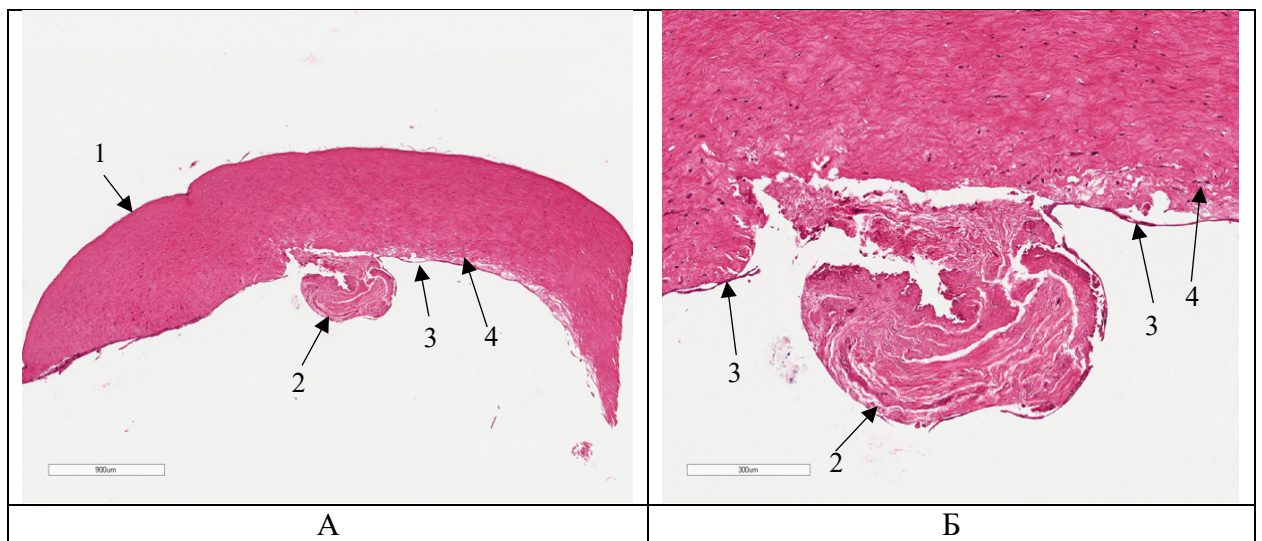


Рисунок 23 – Гистологический препарат донорской роговицы человека с «БМ+». Окраска гематоксилин-эозин (предоставлено к.м.н. Шацких А.В.). А

(ув. 800 ум) – общий вид среза; Б (ув. 300 ум) – лимбальный трансплантат фиксированный в интрастромальном туннеле; В (ув.300 ум) – рост клеток в вертикальном направлении; Г (ув. 80 ум) – пролиферат новообразованных клеток. Под цифрами обозначено: 1 – БМ; 2 – лимбальный трансплантат; 3 – слой эпителиальных клеток; 4 – строма.

Результаты гистологического исследования 1/3 половин роговицы с «БМ-».

Трансплантат свободно расположен в туннеле со стороны стромы роговицы противоположной БМ (Рисунок 24, А). По обе стороны от трансплантата имеется пролифация новообразованного эпителия (Рисунок 24, Б), переходящего через срез стромы на противоположную сторону (с БМ). В пролиферате клетки представлены 1-2 слоями (с правильной вертикальной стратификацией), с признаками дифференцировки, среди клеток отчетливо виден базальный слой (Рисунок 24, В, Г).



3 →

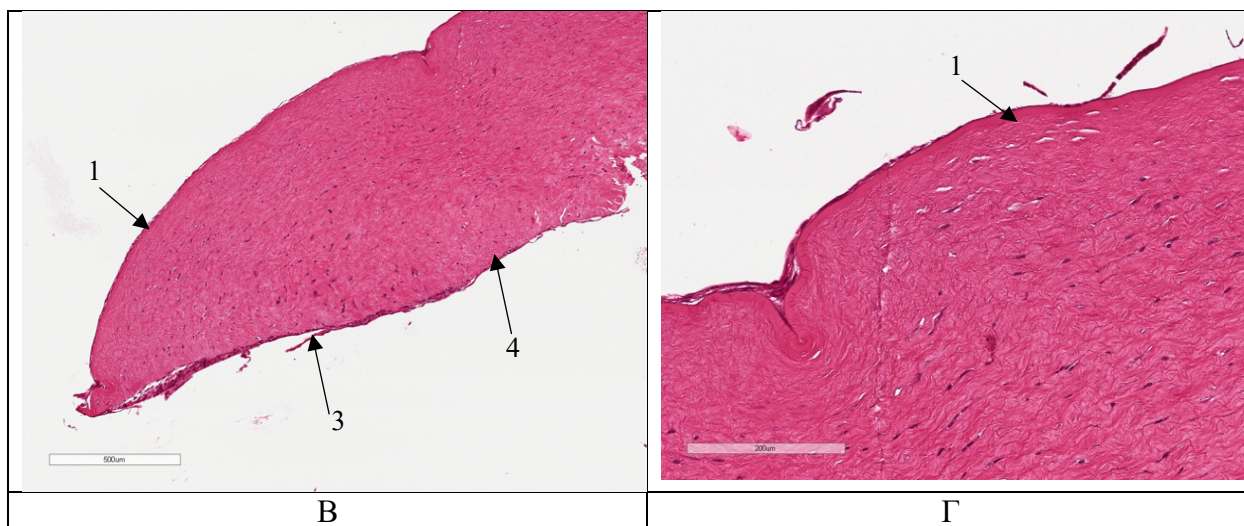


Рисунок 24 – Гистологический препарат донорской роговицы человека. Окраска гематоксилин-эозин (предоставлено к.м.н. Шацких А.В.). А (ув. 800 ум) – общий вид среза; Б (ув. 300 ум) – часть лимбального трансплантата находящегося в интрастромальном туннеле; В (ув. 500 ум) – рост клеток в направлении БМ; Г (ув. 200 ум) – эпителий на поверхности БМ. Под цифрами обозначено: 1 – БМ; 2 – лимбальный трансплантат; 3 – слой эпителиальных клеток; 4 – строма.

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

При анализе обзорных снимков СЭМ роговиц обеих групп, культивированных в течение 24 дней, была выявлена четкая визуализация границ лимбального трансплантата, расположенного в интрастромальном туннеле, верхняя часть трансплантата плотно прилегала к поверхности роговицы. Отмечался выход эпителио-подобных клеток из просвета стромального кармана, а также из зоны прилегания трансплантата, распространение клеточного монослоя наблюдалось преимущественно от периферии к центру роговицы (границы обозначены красным пунктиром), что определялось по характерным структурным изменениям клеточной цитоплазмы в сформированном монослое (рисунок 25-26).

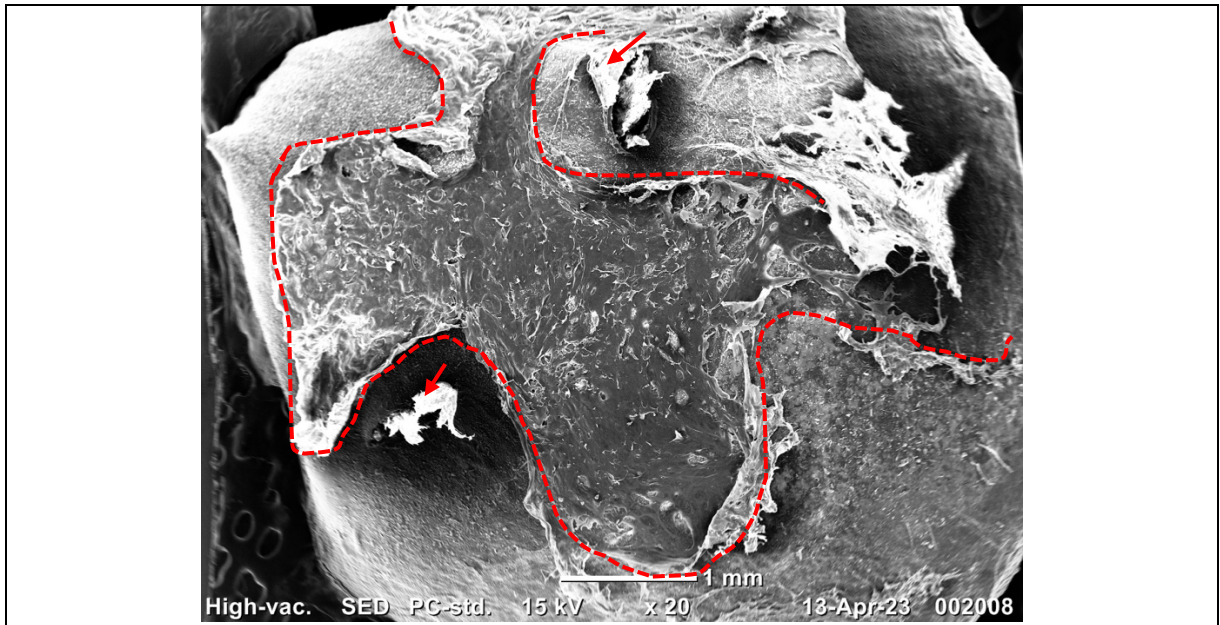


Рисунок 25 – Сканирующая электронная микроскопия части донорской роговицы с сохраненной БМ и лимбальными трансплантатами в туннелях (красные стрелки).

Также была выявлена более выраженная адгезия клеточного монослоя в зоне непосредственного расположения трансплантата, по мере удаления от трансплантата степень клеточной адгезии падала, что проявилось в деформационном закручивании клеточного монослоя, индуцированного дегидратацией материала в процессе пробоподготовки образцов. Существенных различий между образцами «БМ+» и «БМ-» выявлено не было.

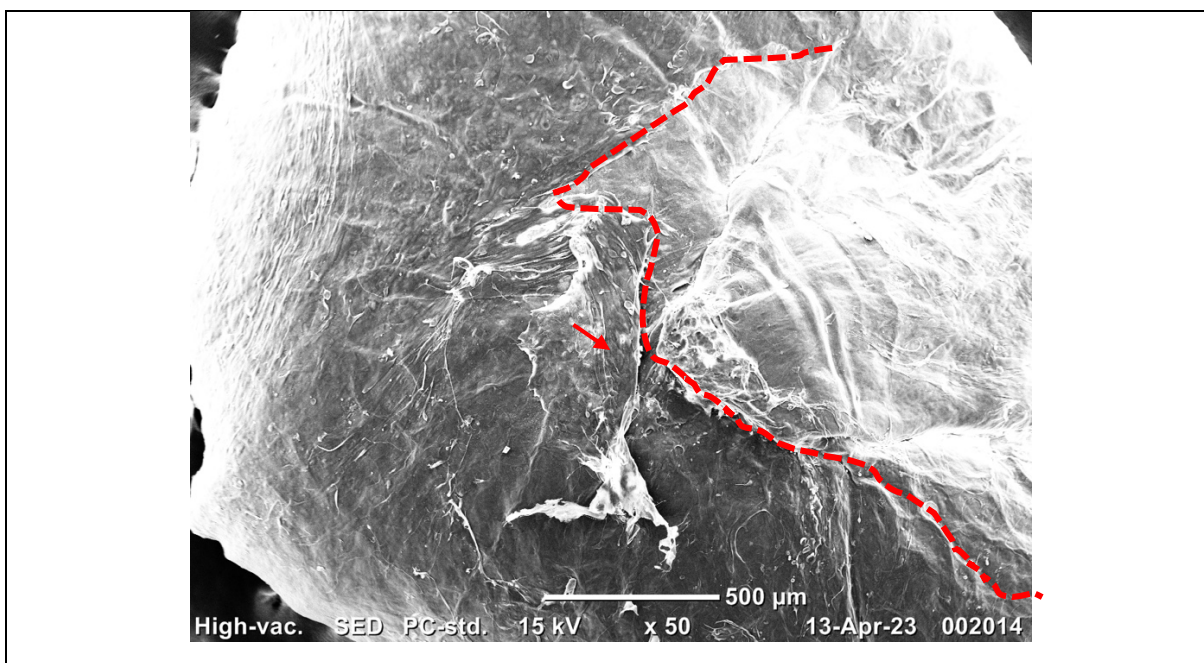


Рисунок 26 – Сканирующая электронная микроскопия части донорской роговицы с лимбальным трансплантатом (красная стрелка), фиксированным в туннеле на поверхности стромы.

Результаты ИГХ исследования роговицы с «БМ+».

Культивирование роговиц выполняли до срока в 24 дня. ИГХ окрашивание срезов роговицы проводили в зоне визуализации трансплантата в интрастромальном туннеле. В первую очередь анализировали маркеры, характерные для роговичного эпителия - К3, К12 и маркера базальных клеток эпителия - К19, в тоже время оценивали экспрессию маркеров Л-МСК CD 90, CD 105. Пролиферативную активность клеток оценивали по маркеру p63. В результате исследования роговиц с «БМ+» была выявлена положительная экспрессия маркеров К12 (++) и p63 (++) что говорит о эпителиальном происхождении клеток выросших и пролиферативной активности на поверхности роговиц с «БМ+» (рисунок 12, А-Б). Экспрессия маркеров Л-МСК (CD 90, CD 105) была выражена слабо (Рисунок 27, В-Г).

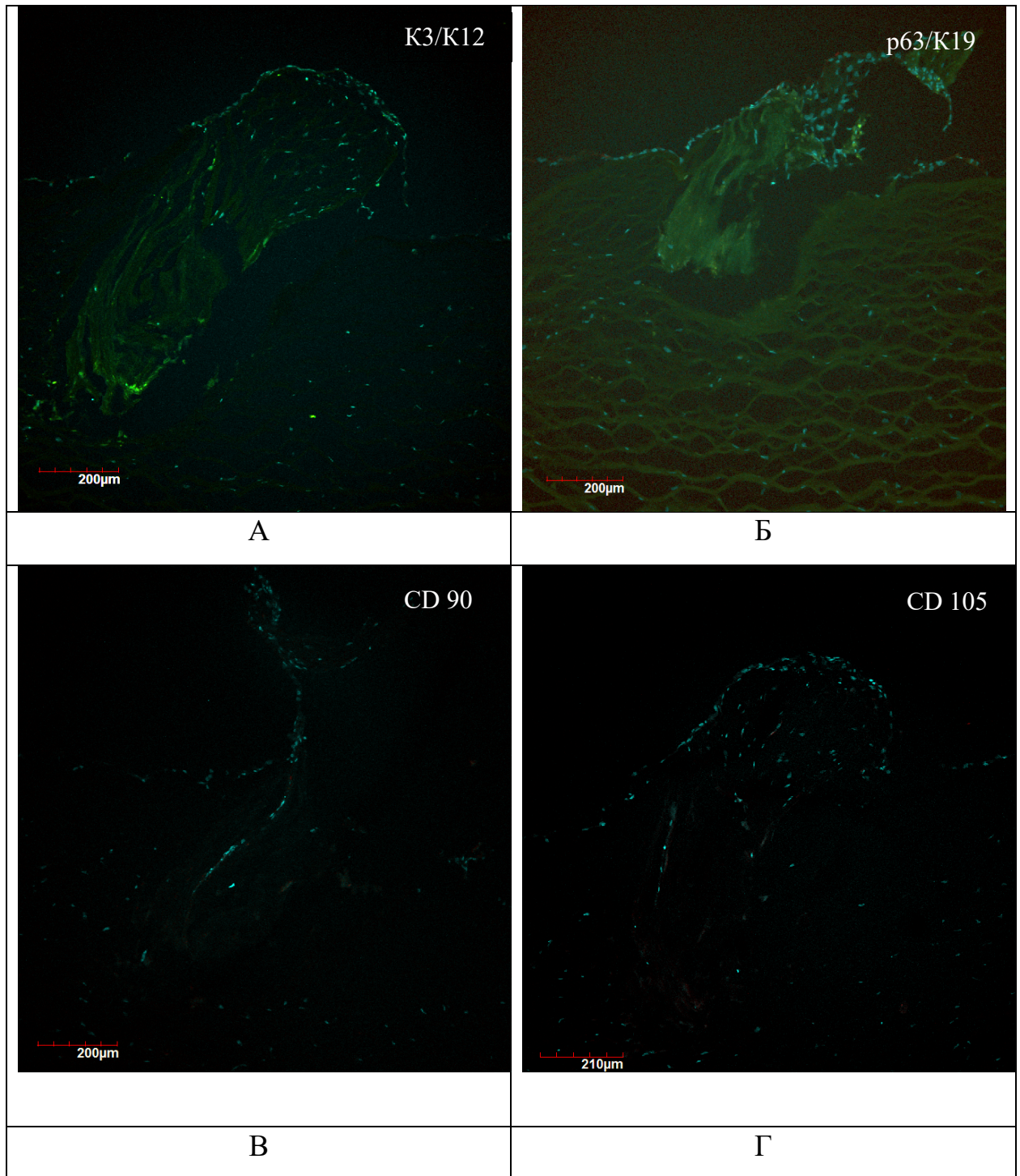
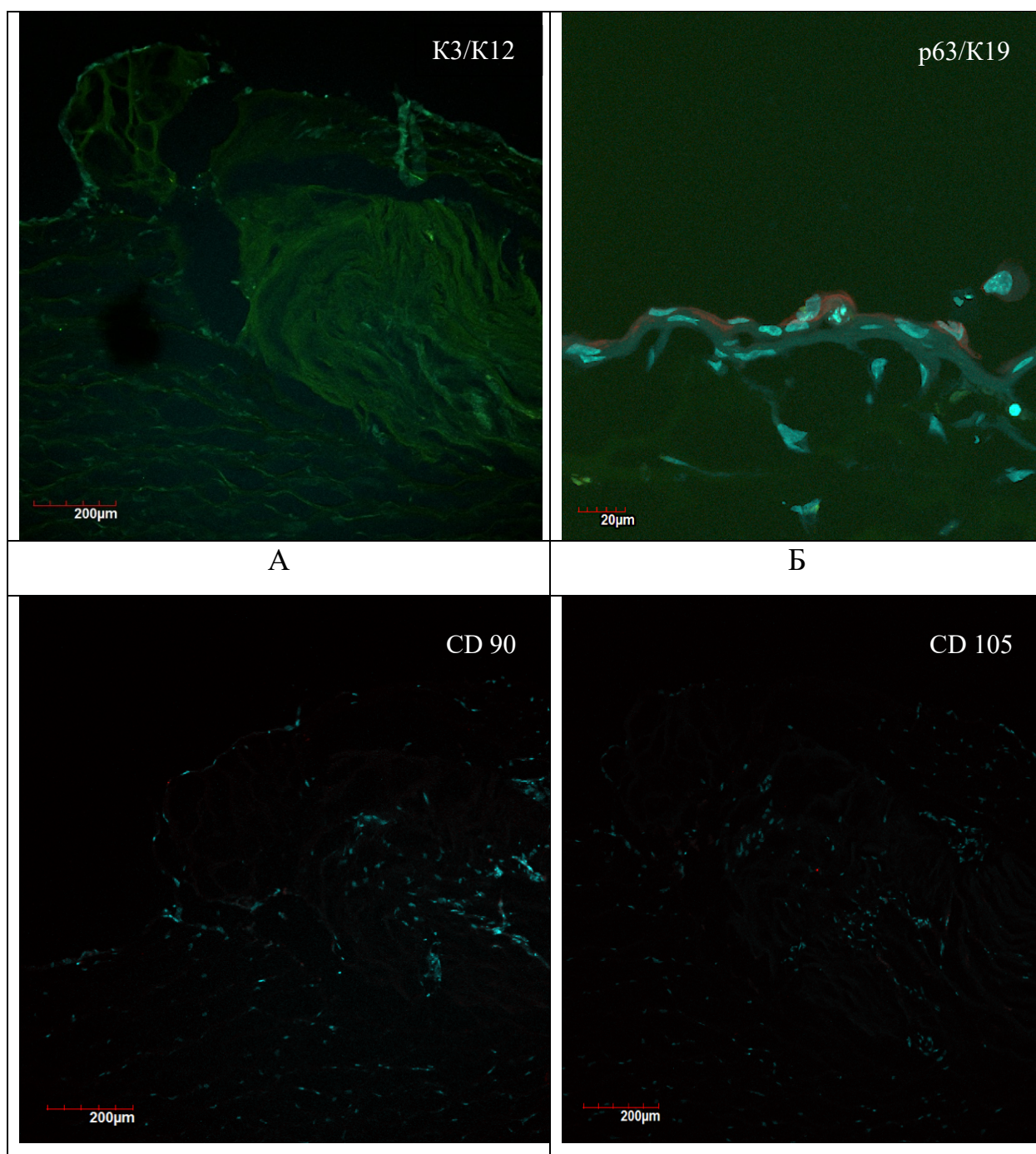


Рисунок 27 – ИГХ - анализ срезов роговицы с сохраненной «БМ+». ИГХ окрашивание, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимида (Hoechst 33258), ув. 200х. А - экспрессия маркеров зрелого эпителия роговицы: К3 (AlexaFluor 549) / К12 (AlexaFluor 488). Б - Экспрессия маркера пролиферации клеток р63 (AlexaFluor 488) и К19 (AlexaFluor 549) - маркера базальных клеток эпителия. Экспрессия маркеров Л-МСК роговицы: В – CD 90 (AlexaFluor 488) и Г – CD 105 (AlexaFluor 488).

Результаты ИГХ исследования роговицы «БМ-».

В результате ИГХ исследования роговиц с «БМ-» была выявлена положительная экспрессия маркера К12 (++) и слабоположительная К19(+), которые говорят об эпителиальном происхождении клеток выросших на поверхности роговиц с «БМ-», слабая экспрессия p63 (+), свидетельствует о сохранной пролиферативной активности клеток (рисунок 27, А-Б). Экспрессия маркеров Л-МСК была выражена слабо (CD 90, CD 105) (Рисунок 28, В-Г).



В	Г
---	---

Рисунок 28 – ИГХ - анализ срезов роговиц «БМ-». ИГХ окрашивание, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимида (*Hoechst 33258*), ув. 200х. А - Экспрессия маркеров зрелого эпителия роговиц К3 (*AlexaFluor 549*) / К12 (*AlexaFluor 488*). Б - Р63-Экспрессия маркера пролиферации клеток р63 (*AlexaFluor 488*) и К19 (*AlexaFluor 549*) - маркера базальных клеток эпителия. Экспрессия маркеров Л-МСК роговицы: В – CD 90 (*AlexaFluor 488*) и Г – CD 105 (*AlexaFluor 488*).

Таким образом, экспериментальное моделирование процесса ре-эпителизации на донорских роговицах продемонстрировало активный рост клеток вне зависимости от поверхности роговицы (стромы или БМ), который подтвердился на гистологическом исследовании, СЭМ, ИГХ исследовании, где было выявлено, что к 24 дням культивирования клетки растут по обе стороны роговицы из лимбальных трансплантатов, фиксированных в интрастромальном туннеле. Фенотипические клетки являются эпителиальными (положительные маркеры К12, К19) и имеют слабый потенциал к пролиферации (положительный маркер р 63). Проведенные исследования на модельных роговицах в полной мере обосновывают целесообразность проведения операции по технологии G-SLET в том числе совместно с послойной кератопластикой роговицы.

ГЛАВА 4. ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе описаны лабораторные методы и результаты исследования пациентов: 1) по методике ИЦ с описанием техники забора клеток с поверхности роговицы с помощью мазков-отпечатков; разработанным протоколом ИЦХ окрашивания клеток и результатами проведенного исследования пациентов; 2) ИФА слезной жидкости взятый у пациентов с СЛН на различных сроках с установлением количества про- и противовоспалительных цитокинов в СЖ для определения взаимосвязи между сроками лечения и этиологии заболевания. Все представленные исследования были проведены в лаборатории Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (руководитель центра – д.м.н., профессор Борзенко С.А).

4.1. Импрессионная цитология и иммуноцитохимическое исследование

Особенности выполнения забора клеток с поверхности роговицы по методике ИЦ:

1. Выполнение исследования удобнее всего проводить пациенту лежа, перед началом процедуры необходимо закапать несколько капель анестетика в исследуемый глаз.

**Стоит отметить, что выполнение ИЦ не желательно пациентам с персистирующей эрозией роговицы и детям. Не рекомендуется также проводить данную процедуру после закапывания флюоресцеина, антибиотиков и других лекарственных средств, а также выполнения ЛСКМ роговицы. Промежуток между двумя исследованиями должен составлять не менее 7 дней.*

2. На исследуемый глаз следует установить векорасширитель. Фильтровальный диск (метилцеллюлозную мембрану из стерильного шприцевого фильтра диаметр - 13 мм, размер пор – 0,45 мкм, FMC401013, Jet Bio-Filtration Co., Ltd., Китай) необходимо извлекать строго в условиях процедурного кабинета, исследователь должен предварительно надеть

перчатки, маску и шапочку. Для удобства извлечения диска рекомендуется использовать пинцет без зубчиков.

3. Перед непосредственным прикладыванием диска на поверхность роговицы следует её тщательно просушить. Импрессия выполняется строго матовой стороной диска 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.

**Диск имеет свойство к большой адгезии к поверхности роговицы, что не исключает его повреждения в момент удаления, при такой ситуации возможно нанесение 1-2 увлажняющих капель для быстрого удаления мембраны.*

**Пациента необходимо предупредить о возможном дискомфорте и ощущении тумана перед глазами после исследования на протяжении нескольких дней. Следует назначить антибактериальный препарат и антисептик после процедуры на 3 дня по 3 раза в день.*

4. Образец следует фиксировать в 96%-ном растворе этанола и хранить при 4⁰С. Срок хранения составляет до 6 мес.

5. Перед выполнением окрашивания образцы отмывают от фиксатора, далее клетки окрашивают первичными, а затем вторичными антителами, меченными флюорохромами.

6. В конце производят контрастирование клеточных ядер и сборку слайдов для последующего изучения образцов на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе.

Подробный пошаговый протокол окраски образцов ИЦ (Таблица 11):

Шаг 1 - аспирация фиксатора из чашки Петри;

Шаг 2 - отмывание от фиксатора раствором фосфатно-солевого буфера (PBS, рН 7,4) трехкратно по 5 минут при температуре 25 °С;

Шаг 3 – пермеабиллизация клеточных мембран 0,3% раствора Triton X-100 (A4975, AppliChem) в фосфатно-буферном растворе (PBST) в течение 15 мин при температуре 25 °С;

Шаг 4 - отмывание от раствора тритона X-100 раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25 °С;

Шаг 5 – инкубирование образцов в блокирующем растворе (1% бычий сывороточный альбумин (LY-0081.050, Paneco) с 0,1% Twin 20 (A4974, AppliChem) в PBS) в течение 1 ч. при температуре 25 °С;

Шаг 6 – окрашивание клеток первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе, в течение 16 часов при температуре 4 °С. Для выявления экспрессии маркеров использовали первичные антитела к кератинам 7 (K7, клон OV-TL 12/30, 1:100, ab216016, мышиный моноклональный, Abcam, Великобритания; кератин 12 (K12, 1:100, ab185627, моноклональный кролик, Abcam) и кератин 19 (K19, 1:100, ab9221) и инкубировали в течение 2 часов при 37°C в увлажненной камере. В контрольные образцы первичные антитела не добавляли, а использовали тот же объем блокирующего раствора.

Шаг 7 - отмывание от первичных антител раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25 °С;

Шаг 8 – окрашивание и инкубирование образцов с парными вторичными флуоресцентными антителами (Alexa Fluor ® 488 (1:250, ab150077, козий анти-кролик, Abcam) или Alexa Fluor ® 594 (1:250, ab150116, козий анти-мышь, Abcam) конъюгированные с флуорохромным красителем и разведенных в блокирующем растворе в увлажненной камере в течение 1 часа при температуре 24°C в темноте;

Шаг 9 - отмывание от раствора с вторичными антителами раствором PBS трехкратно по 5 минут при температуре 25 °С;

Шаг 10 - окрашивание ядер клеток с ДНК-связывающим красителем бис-бензидимом (Hoechst 33258) в концентрации 0,1 мг/мл в растворе PBS в течение 10 минут при температуре 25 °С;

Шаг 11 - образцы промывали дистиллированной водой в течение 5 минут и монтировали под покровное стекло с использованием монтажной среды (VitroGel®, 12-001, BioVitrum, Москва, Российская Федерация) и покровных стекол толщиной 0,13 мм (BB018024A1, Menzel Gläser, Брауншвейг, Германия).

Шаг 12 - хранение готовых препаратов ИЦ до выполнения лазерной сканирующей конфокальной микроскопии при 4 °С не более 48 часов. Образцы оценивали и фотографировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (Fluoview FV10i, Olympus, Токио, Япония).

Таблица 11 – Образец пошагового протокола окрашивания для ИЦХ исследования.

№	Манипуляция	Температура	Время	Готовность выполнения (пример)		
1	Фиксирование в 96% этиловом спирте	+4°С	часов	38 часов		
2	Отмывание в растворе PBS	комнатная температура	3 раза по 5 минут	10:30	10:35	10:40
3	Фенестрирование мембран клеток в PBST (0,3% Triton X-100 в PBS)	комнатная температура	15 минут	10:40-10:55		

4	Отмывание в растворе PBS	комнатная температура	3 раза по 5 минут	10:55	11:00	11:05
5	Инкубирование в блокирующем растворе (1% BSA в PBS + 0.1% Tween 20)	комнатная температура	1 час	11:05-12:05		
6	Разведение первичных антител (АТ) в блокирующем растворе	подготовить за 15 минут, +4 ⁰ С	-	×		
7	Инкубация с первичными АТ	комнатная температура, влажная камера	1 час	12:05-13:05		
8	Отмывание в PBS	комнатная температура	3 раза по 5 минут	13:05	13:10	13:15
9	Разведение вторичных фл АТ в блокирующем растворе	+4 ⁰ С, в темноте	-	×		
10	Инкубация с вторичными АТ	в темноте, комнатная температура, влажная камера	1 час	13:15-14:15		
11	Отмывание в PBS	в темноте, комнатная температура, влажная камера	3 раза по 5 минут	14:15	14:20	14:25
12	Инкубация с ядерным красителем (разводить в дистилляте!)	в темноте, комнатная температура, влажная камера	2-5 минут	14:25-14:30		
13	Отмывание в PBS	в темноте, комнатная температура, влажная камера	5 минут	14:35		
14	Монтирование	в темноте, комнатная температура,	-	×		

		влажная камера		
15	Хранение	в темноте, комнатная температура, влажная камера	-	×

4.2. 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:

- 1) **первая группа** состояла из пациентов с **полным** односторонним СЛН (n=15);
- 2) **вторая группа** включала пациентов с **не полным** односторонним СЛН (n=9).

Анализ концентрации цитокинов проводили до и после операции на сроках: 3, 6 и 12 месяцев. Образцы слезы от каждого пациента собирали в 0,25 мл пробирки типа Эппендорф, хранили в герметичной упаковке в низкотемпературном морозильнике (-40°C). Количественную оценку содержания Интерлейкинов (ИЛ) 1b (A-8766); ИЛ-2 (A-8772); ИЛ-4(A-8754); ИЛ-8 (A-8762) (Вектор бест; Россия) ИЛ-10 (BMS215-2); TNF- α (BMS223-4) (Thermo Fisher scientific; США), TGF- β (ab100647, Abcam, Великобритания) в образцах слез, проводили методом иммуноферментного анализа по стандартному протоколу соответствующего производителя. Для определения концентрации интерлейкинов образцы размораживали при комнатной температуре. Объем всех образцов доводили до 200 мкл стерильным раствором PBS (Thermo Fisher scientific; США) степень разведения учитывали в программном обеспечении спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Fisher scientific; США). Статистическую обработку полученных данных проводили в GraphPad Prism7.

4.3. Результаты иммуноцитохимического исследования с окрашиванием по методике импрессионной цитологии

ИЦ с последующим ИЦХ анализом, во-первых, может применяться как способ повышения точности при диагностике у пациентов с неоднозначным мнением о правильности постановки диагноза СЛН на основании базовых и дополнительных методов обследования (см. главу 2, раздел 2.2.3.). Во-вторых, ИЦ с ИЦХ может использоваться в научных целях для подтверждения результатов операций по пересадке ЛСК на глаз с СЛН на основе выявления специфических кератинов. В этом случае может быть подтверждены полный анатомический успех (восстановление роговичного эпителия или частичная ре-конъюнктивализация на периферии), а также частичный успех (врастание эпителия в зону средней периферии роговицы).

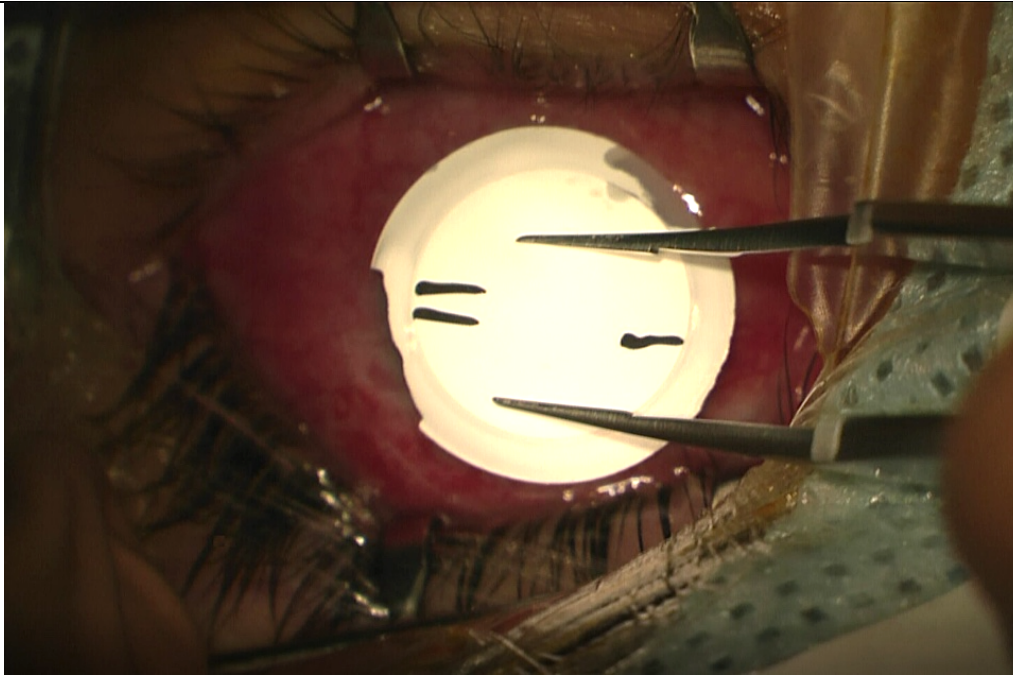
При разработке метода окраски отпечатков роговицы на кератины и включения этого диагностического метода в алгоритм диагностики СЛН нами был выполнен анализ литературы. Выявлено, что для определения наличия клеток конъюнктивы на поверхности роговицы (абсолютный признак СЛН) исследователи использовали специфический муцин БК конъюнктивы (MUC5AC), а также наличие К7 и К19. С учётом того, что отсутствие окраски на MUC5AC может являться ложноотрицательным результатом, этот маркер был исключён из дальнейшего изучения. К19 в свою очередь может выявляться в клетках роговицы на периферии ближе к лимбу и таким образом давать ложноположительный результат. В то же время при окраске образцов ИЦ на специфический клон К7 (OV-TL 12/30) из здоровых и патологических роговиц было показано, что именно этот маркер демонстрирует чёткую линию разграничения между роговичным и конъюнктивальным эпителиями в зоне лимба роговицы в образцах со здоровых роговиц [148]. В клинических образцах окраска на кератин 7 (OV-TL 12/30) была эффективна у пациентов с подтверждённым диагнозом СЛН как одно-, так и двусторонним. Для верификации роговичного эпителия в экспериментальных и клинических работах использовали маркеры зрелого эпителия – К3 и 12, которые

экспрессируются в поверхностных клетках. Для выполнения этой части исследования нами использованы К7 (клон OV-TL 12/30), 19 и 12 ввиду возможности составления пары из указанных антител для одновременной окраски на два маркера: «К7 (красный) + К12 (зелёный)» или «К19 (красный) + К12 (зелёный)». Такой вариант позволяет упростить диагностику и сократить число образцов ИЦ до одного. Для подтверждения наличия собственно клеток на образце ИЦ был выбран маркер бис-бензимидазин (*Hoechst 33258*), окрашивающий только ядро клетки.

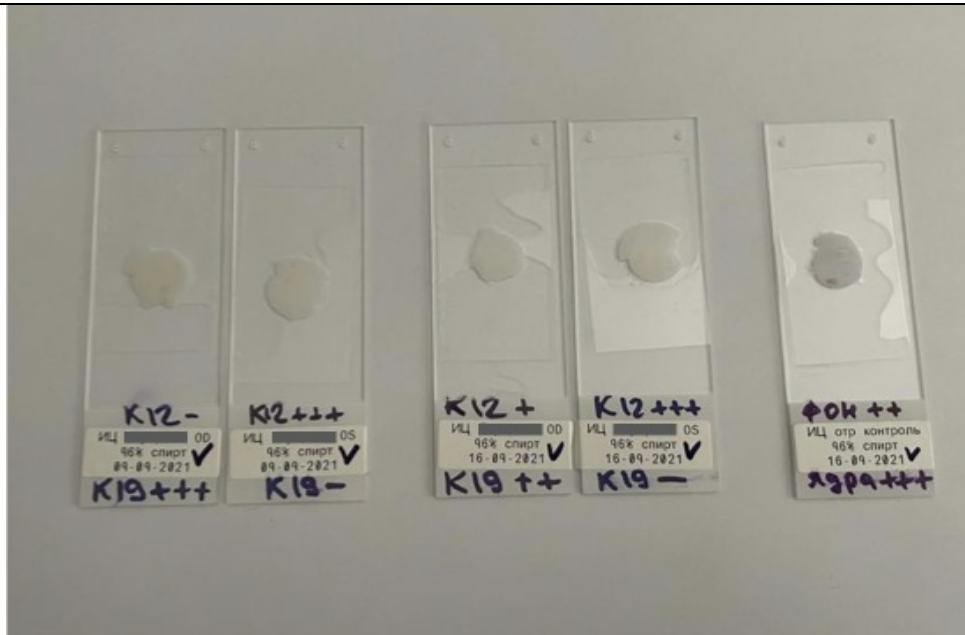
Таким образом, для определения наличия клеток на образце (качественно выполненная ИЦ) использовали бис-бензимидазин; для выявления конъюнктивальных клеток (абсолютный признак СЛН) – К7 (клон OV-TL 12/30) и 19; для выявления роговичных клеток – К12 (зрелый роговичный эпителий).

На первом этапе обрабатывали собственно процесс получения ИЦ у пациентов и на донорских трупных роговицах. Затем проводили пробные ИЦХ полученных образцов на К7, 12 и 19. После оценки пробной окраски окончательно выбирали комбинацию К для верификации конъюнктивального и роговичного эпителиев. Наконец, эту диагностическую пару антител использовали у пациентов с сомнительным диагнозом СЛН и включения процедуры ИЦ в алгоритм диагностики СЛН.

Образцы ИЦ, полученные от у пациентов и на донорских трупных роговицах окрашивали по протоколу на К19 и К12 для определения качества экспрессии этих маркеров. Этапы получения образцов ИЦ, окраски и их подготовки для получения снимков в ЛСКМ показаны на рисунке 29.



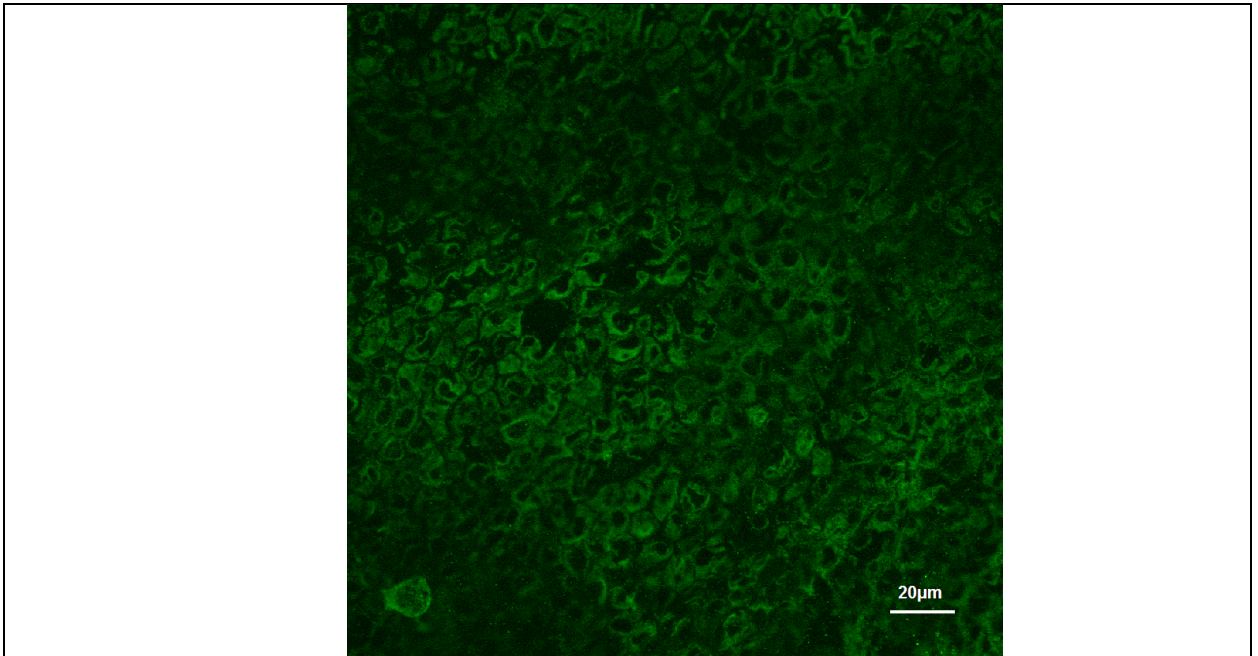
А



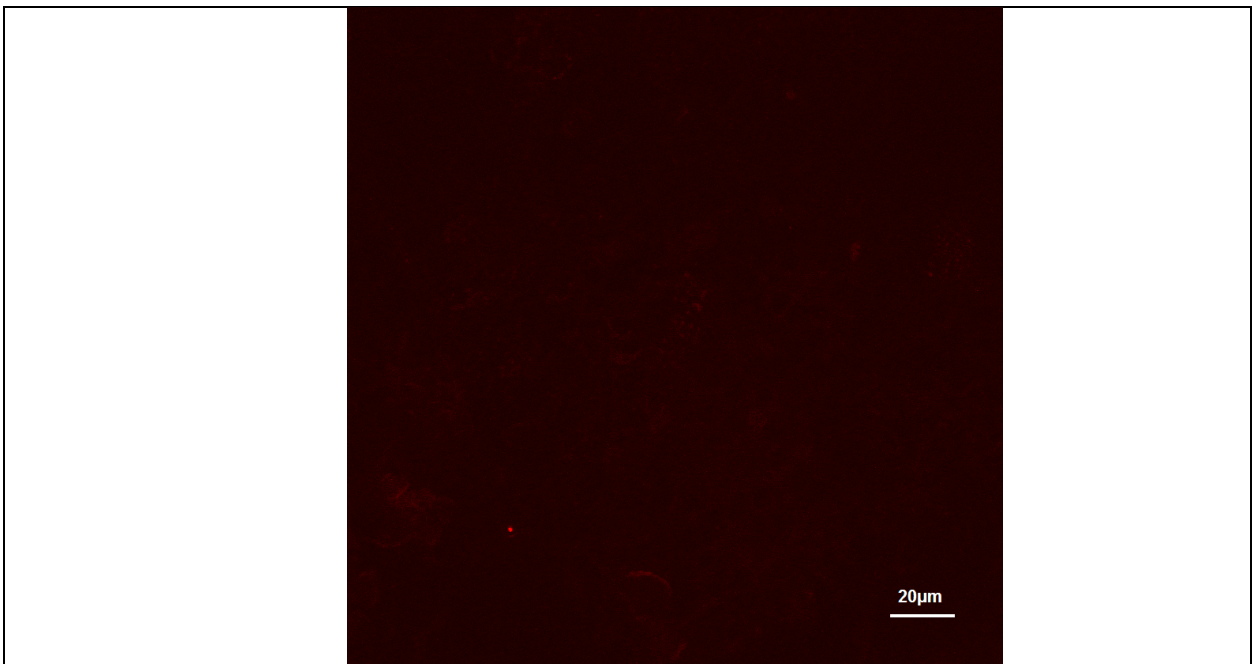
Б

Рисунок 29 – Этапы получения, окраски и подготовки для анализа отпечатков с роговицы. А – мазок отпечаток (ИЦ) с поверхности роговицы с использованием стерильного целлюлозного фильтра. Б - образцы ИЦ, окрашенные и заключённые под покрывное стекло, перед выполнением ЛСКМ.

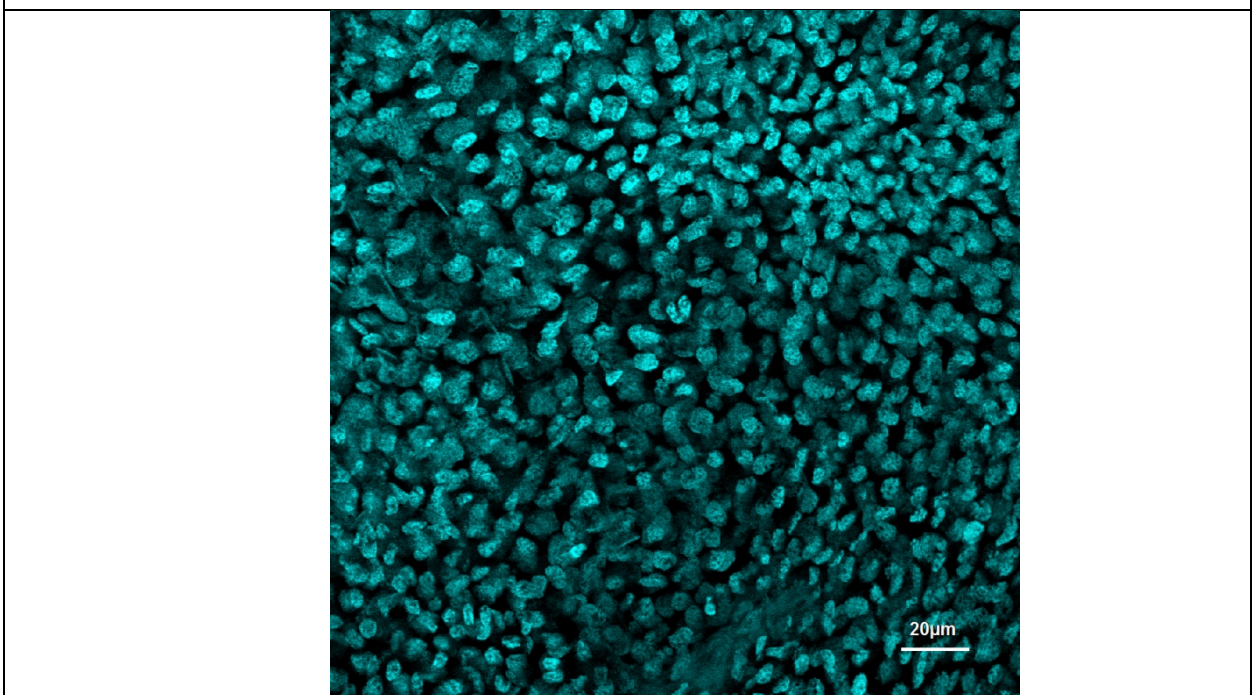
В образцах ИЦ с центральной части роговицы донорского трупного глаза было отмечено обилие хорошо окрашенных ядер (+++), показывающих, что отпечаток был выполнен качественно и в образце имеются клетки (рисунок 30, В). Окраска на К12 показала выраженную (зелёный, +++) экспрессию, что подтверждает наличие здорового эпителия в отпечатке (рисунок 30, А). При окраске на К19 (рисунок 30, Б) обнаруживали клетки экспрессирующие этот маркер (красный, +, слабая экспрессия), несмотря на то что образец был получен из центральной зоны роговицы из донорского трупного глаза без СЛН. Так же экспрессия К19 сопровождалась слабой фоновой окраской вокруг клеток.



А – окраска на роговичный К12 (**AlexaFluor 488**), выраженная экспрессия (+++).

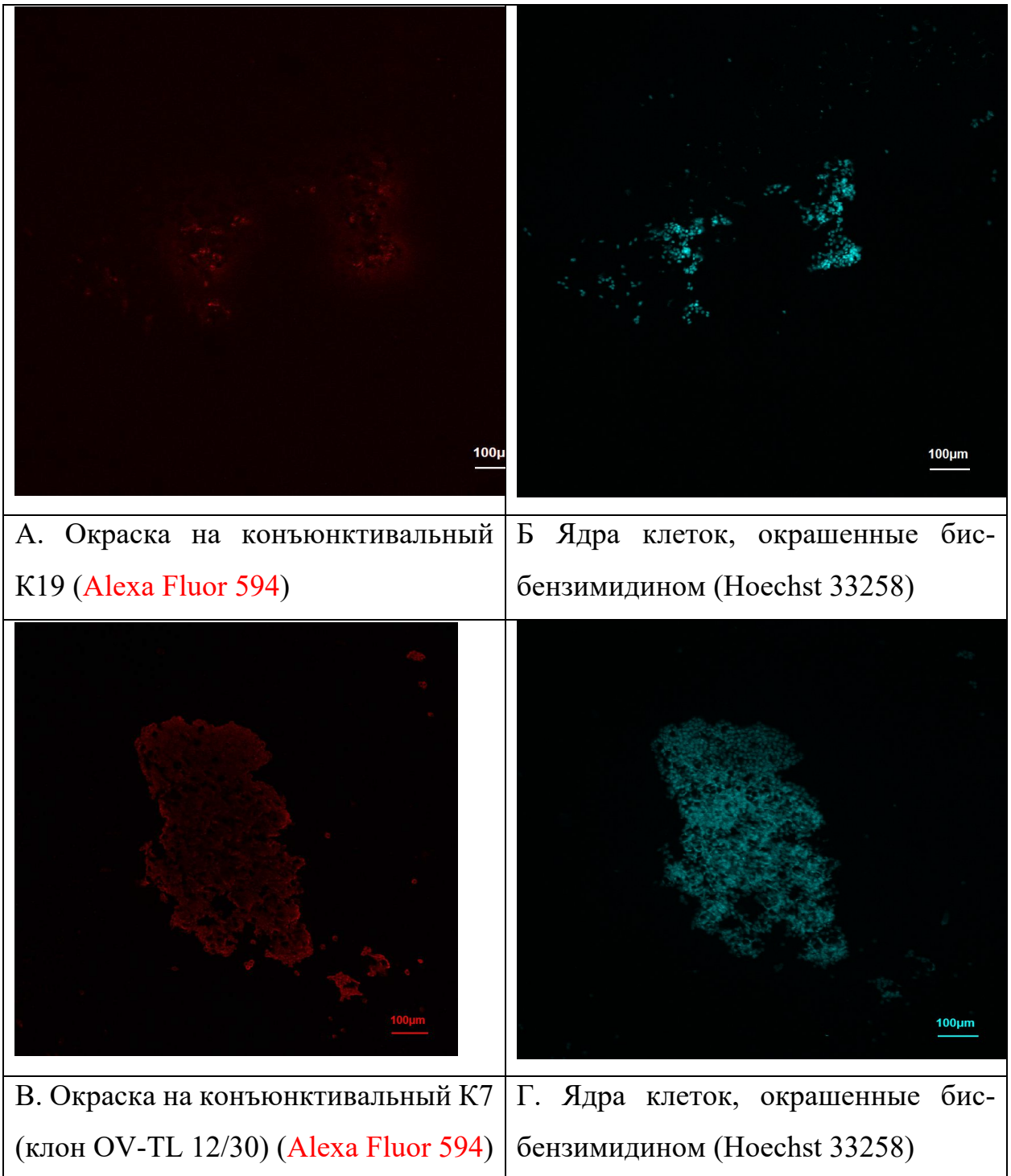


Б – окраска на конъюнктивный К19 (Alexa Fluor 594), слабая экспрессия (+) с окружающим фоном.



В – Ядра клеток, окрашенные бис-бензимидамином (Hoechst 33258), выраженная экспрессия (+++).

Рисунок 30 – Пример отпечатков с донорских трупных роговиц для отработки первичного протокола окрашивания. ИЦХ, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимидам (Hoechst 33258), ув. 600х.



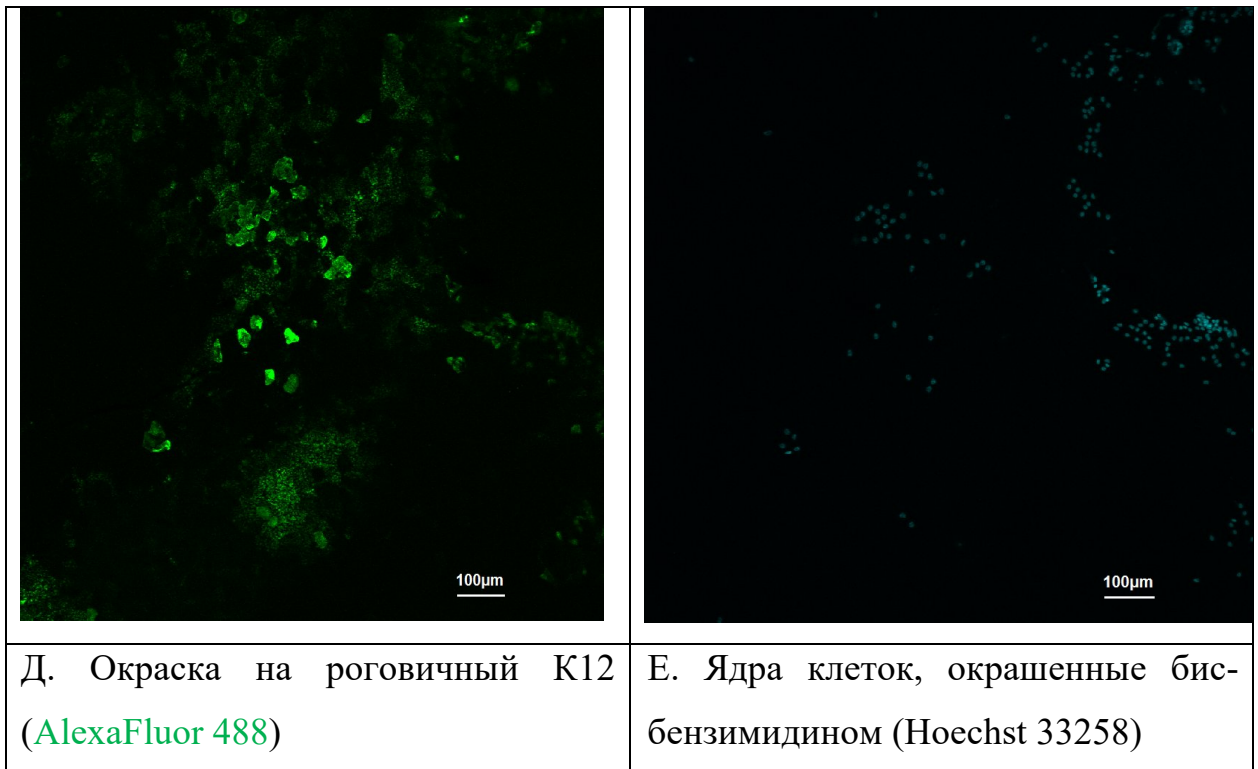


Рисунок 31 – Пример отпечатков с роговицы пациентов с односторонним полным СЛН для отработки первичного протокола окрашивания. ИЦХ, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимида (Hoechst 33258), ув. 600х. А – окраска на конъюнктивальный К19 (Alexa Fluor 594), умеренная экспрессия (++) с окружающим фоном. В – окраска на конъюнктивальный К7 (клон OV-TL 12/30) (Alexa Fluor 594), выраженная экспрессия (+++) без окружающего фона. Д – окраска на роговичный К12 (AlexaFluor 488), выраженная экспрессия (+++). Б, Г, Е – Ядра клеток, окрашенные бис-бензимидином (Hoechst 33258), выраженная экспрессия (+++). Корреспондирующие изображения для пар А-Б, В-Г и Д-Е.

В образцах ИЦ с центральной части роговицы пациентов с СЛН было отмечено наличие хорошо окрашенных ядер (+++), которые как правило были сгруппированы (рисунок 31 Б, Г, Е). Окраска на К12 показала выраженную (зелёный, +++) экспрессию (рисунок 31, Д). При окраске на К19 (рисунок 31, А) обнаруживались клетки экспрессирующие этот маркер (красный, ++, умеренная экспрессия). Однако экспрессия К19 сопровождалась выраженной

фоновой окраской вокруг клеток (рисунок 31, А). Экспрессия К7 (клон OV-TL 12/30) была выраженной и без какого-либо фонового окрашивания (рисунок 31, В).

Таким образом, при обработке протокола окраски образцов ИЦ было выявлено что К19 может иметь ложноположительную окраску (трупные донорские роговицы). Он также 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-бензimid – наличие клеток. Поэтому в дальнейшем для верификации конъюнктивальных клеток в образцах ИЦ использовали пару «К7 (красный) + К12 (зелёный)».

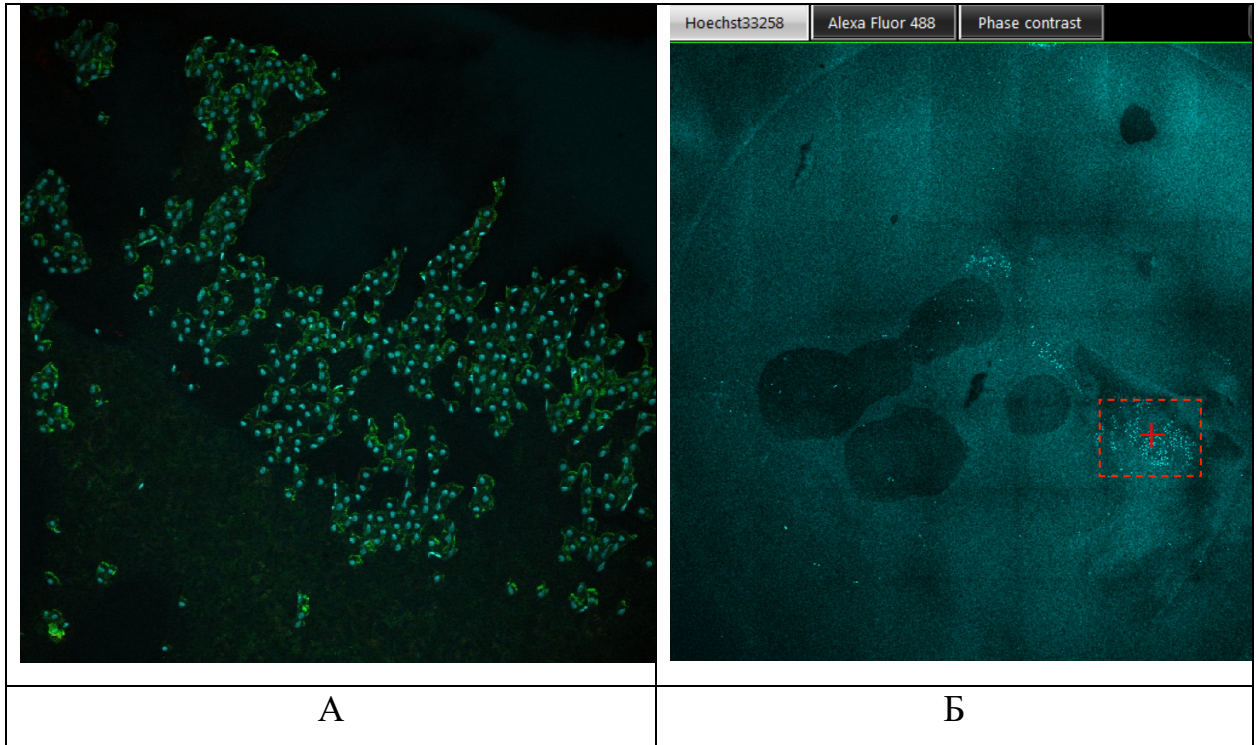
В клинической группе из 26 пациентов с сомнительной биомикроскопической картиной для подтверждения диагноза СЛН были окрашены и проанализированы образцы ИЦ от 11 пациентов (таблица 12). Из них у двух пациентов результаты ИЦ не позволили подтвердить диагноз СЛН по причине отсутствия экспрессии конъюнктивального К7 (таблица 12, № 6 и 8) и по этой причине были исключены из исследования.

Таблица 12 – Результаты анализа образцов ИЦ у пациентов с сомнительным диагнозом СЛН.

№ пациента	Глаз	Ядра	К7	К12
1	OD	+++	+	+++
2	OD	+++	++ (на периферии)	++
3	OS	+++	++	++
4	OD	+++	+	+++
5	OD	+++	++	+

6	OD	++	0	+
7	OS	++	+++	0
8	OD	+++	0	++
9	OS	+++	+++	+
10	OD	+++	++	0
11	OD	+++	++	++

У одного из пациентов была выполнена ИЦ на обоих глазах. На здоровом глазу экспрессировался K12 (зелёный) (рисунок 32 А, Б) в центральной зоне в форме конгломерата клеток. Экспрессии K7 не отмечали (рисунок 32 А). На глазу с сомнительным СЛН отмечали характерный паттерн инвазии клеток, которые экспрессировали K7 (красный, рисунок 32 В) в центральной области отпечатка (рисунок 32 Г). Данный элемент был окружён клетками с яркой экспрессией K12 (зелёный, рисунок 32 В).



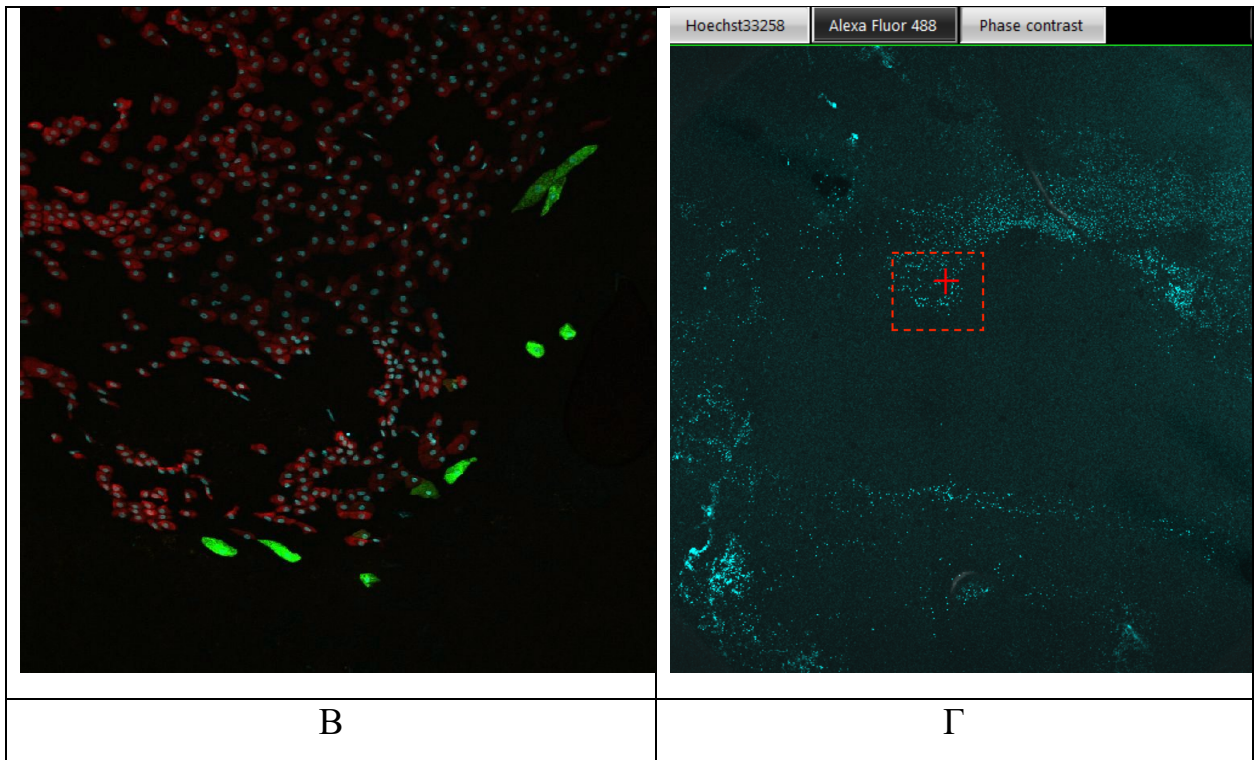


Рисунок 32 – Пример отпечатков с роговиц пациента с односторонним частичным СЛН обоих глазах (ИЦ с флуоресценцией) для отработки протокола окрашивания на два К. ИЦХ, ЛСКМ, ядра контрастированы красителем бис-бензимида (Hoechst 33258), ув. 600х. А – одномоментная окраска на роговичный К12 (AlexaFluor 488) выраженная экспрессия (+++), множество окрашенных клеток и конъюнктивальный К7 (клон OV-TL 12/30) (Alexa Fluor 594), отсутствие экспрессии (0). В – одномоментная окраска на роговичный К12 (AlexaFluor 488) выраженная экспрессия (+++), единичные клетки и конъюнктивальный К7 (клон OV-TL 12/30) (Alexa Fluor 594), выраженная экспрессия (+++), множество клеток. Ядра клеток, окрашенные бис-бензимидадином (Hoechst 33258), выраженная экспрессия (+++). Б, Г – обзорная карта микроскопии образца ИЦ. А, Б – правый глаз (здоровый), В, Г – левый глаз (частичный СЛН).

В результате разработки протокола ИЦ с флуоресцентным окрашиванием для выявления специфических кератинов с целью

дифференциальной диагностики СЛН были установлены следующие значимые особенности этой процедуры:

1) Использование К12 как маркера эпителия роговицы эффективно и позволяет подтвердить его наличие в образцах ИЦ от трупов-доноров, со здоровых роговиц и в клинических образцах от пациентов с сомнительным СЛН.

2) Изучение К19 и К7 может быть использовано для выявления в образцах ИЦ клеток конъюнктивы и подтверждения диагноза СЛН.

3) Исследование К7 (клон OV-TL 12/30) позволяет более качественно выявлять клетки конъюнктивы в образцах ИЦ, за счёт яркой экспрессии и отсутствия фона вокруг клеток.

4) Ядерный краситель является средством базового контроля качества при получении ИЦ, так как позволяет достоверно определить наличие клеток на образце для их дальнейшей верификации с помощью подобранных кератинов.

5) Использование окрашивания на два маркера одновременно выполнимо для пары «К7 (красный) + К12 (зелёный)» и позволяет упростить процедуру ИЦ.

6) Антитела к К7 (клон OV-TL 12/30) выпускаются в форме набора с маркировкой «для диагностики *In Vitro*», что позволит внедрить разработанный метод ИЦ в виде лицензированной услуги.

Таким образом, ИЦ является неинвазивным диагностическим инструментом, который может предоставить исчерпывающую информацию о наличии или отсутствии специфических клеточных К и/или муцинов. Стоит отметить, что обнаружение положительной экспрессии высокоспецифичного К7 однозначно говорит в пользу наличия СЛН, в то время как обнаружение маркеров роговичных эпителиоцитов (К12 и К19) предполагает степень сохранности клеток эпителия. В затруднительных случаях установления СЛН

данная методика должна проводиться в первую очередь при соблюдении правил забора образцов и протоколов окрашивания.

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

При анализе полученных результатов было показано отсутствие ИЛ-2 в исследуемых образцах на всех точках эксперимента, концентрация остальных интерлейкинов снижалась к 12 месяцам по отношению к первой точке «до операции».

В группе 1 с полным СЛН (n=15) в дооперационном периоде наблюдалась высокая корреляция ИЛ-8 и ИЛ-4, что обусловлено процессом ре-моделирования соединительной ткани, данные ИЛ ведут себя как модуляторы и не рассматриваются как провоспалительные.

К 6 - 12 месяцам наблюдали клиническую картину приживления ауто-трансплантатов, снижение воспалительных реакций, что коррелирует с лабораторными показателями цитокинового профиля. При этом наблюдали дальнейшее и существенное падение уровней ИЛ-8 и ИЛ-4 ($r=0,97$), а также снижение активности TGF- β , коррелирующего с отсутствием индукции со стороны ИЛ-8 ($r=0,93$) и ИЛ-4 ($r=0,99$). Показано значительное снижение активности других провоспалительных цитокинов TNF- α по отношению к TGF- β ($r=0,89$).

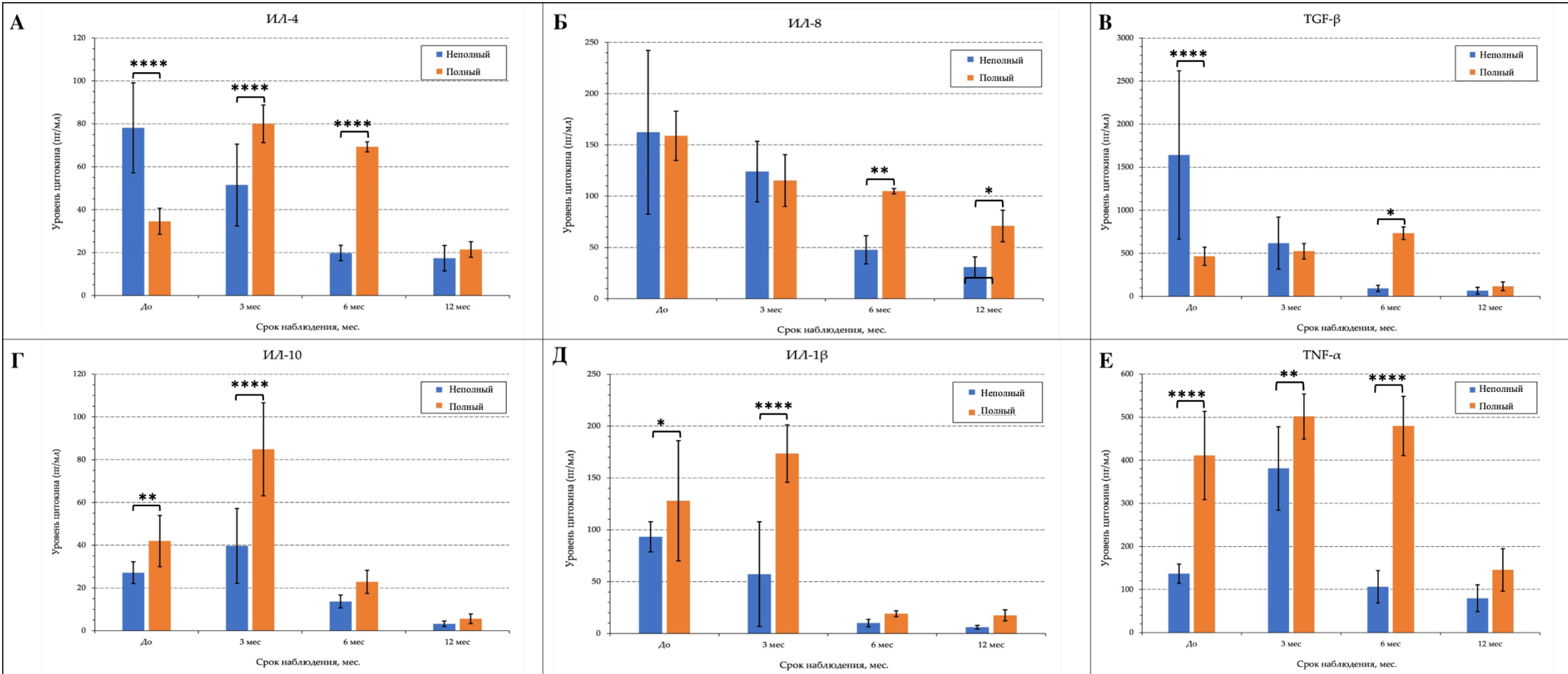
Отмечали плавное снижение концентрации ИЛ-8 в обеих группах сравнения: с полным и не полным СЛН. Достоверно значимые различия снижения концентрации между группами были выявлены на сроке 6 ($p=0,0011$) и 12 месяцев ($p=0,041$). Концентрация ИЛ-4 в группе с неполным СЛН снижалась плавно к 12 месяцев наблюдения. В группе с полным СЛН концентрация изучаемого интерлейкина возрастала к 3-му месяцу, с последующим плавным снижением до 12 месяцев. Достоверные значимые

различия между группами были обнаружены до операции ($p < 0,0001$) и на сроках 3 ($p < 0,0001$) и 6 месяцев ($p < 0,0001$) (см. рисунок 33, Таблицы №14-18).

Во 2 группе с неполным СЛН ($n=9$) до операции воспалительных проявлений как клинически, так и лабораторно не наблюдали. Под действием модулирующего эффекта ИЛ-4 вялотекущий процесс ре-моделирования соединительной ткани был возможен под действием МСК лимба. Это подтверждено лабораторно выявлением высоких уровней цитокина TGF- β , играющего высокую роль в дифференцировке стволовых клеток, который коррелирует с ИЛ-4, оказывающим пролиферативную функцию ($r = 0,68$) (см. рисунок 33, Таблицы №14-18).

В период от полугода до года наблюдалось соответствие клинической картины и показателей цитокинового профиля, которые продолжали уменьшаться ИЛ-8 ИЛ-4 ($r=1,0$), TGF- β к ИЛ-8 ($r=0,91$), TGF- β к ИЛ-4 ($r=0,9$). Средние показатели корреляционной связи ($r=0,67$) с провоспалительным цитокином TNF- α с TGF- β (рисунок 33) могут быть обусловлены тем, что, в клинической картине не наблюдалось процессов вялотекущих и незначительных симптомов воспалительных реакций, таких как: хронические гиперемия глаз, эпителиопатия роговицы, блефаро- и кератоконъюнктивиты, сухость глаз и т.д.

Рисунок 33 – Концентрации уровней цитокинов в образцах слез пациентов с полным и неполным СЛН (после G-SLET) на сроках до, 3, 6 и 12 месяцев (pg/mL).



Концентрации цитокинов в группе с неполным и полным СЛН: А- ИЛ-4; Б-ИЛ-8; В- TGF-β; Г-ИЛ-10; Д- ИЛ-1b; Е- TNF-α.

Концентрация TGF- β в группе с неполным СЛН снижалась плавно к 12 месяцу наблюдения. В группе с полным СЛН концентрация фактора после операции резко возросла с дальнейшим «волнообразным» пиком на сроке 6 месяцев и дальнейшим снижением концентрации к 12 месяцам. Достоверные значимые различия между группами были обнаружены до операции ($p < 0,0001$), в 1-й месяц ($p = 0,003$) и 6-й месяц ($p = 0,0108$). В обеих группах наблюдали увеличение концентрации TNF- α к 3 месяцу, с последующим резким снижением в группе с неполным СЛН и плавным снижением в группе с полным СЛН к 12 месяцу наблюдения. Достоверные значимые различия между группами были обнаружены до операции ($p < 0,0001$) и на сроках 1 месяц ($p = 0,0268$), 3 месяца ($p = 0,0031$) и 6 месяцев ($p < 0,0001$) (Таблицы №14-18).

Концентрация ИЛ-1 β в группе с неполным СЛН снижалась плавно к 12 месяцу наблюдения. В группе с полным СЛН концентрация изучаемого интерлейкина после операции снижалась с последующим резким всплеском к 3-м месяцам и резким падением на 6 месяце с последующей стабилизацией до 12 месяцев. Достоверные значимые различия между группами были обнаружены только на сроке в 3 месяца ($p < 0,0001$) (Таблицы №14-18).

Концентрация ИЛ-10 в обеих группах после операции снижалась с последующим резким всплеском к 3 месяцу и резким падением к 6 месяцу с последующим плавным снижением к 12 месяцам. Достоверные значимые различия между группами были обнаружены до операции ($p = 0,007$), в 1 месяц ($p = 0,0092$) и в 3 месяца ($p < 0,0001$) (Таблицы №14-18).

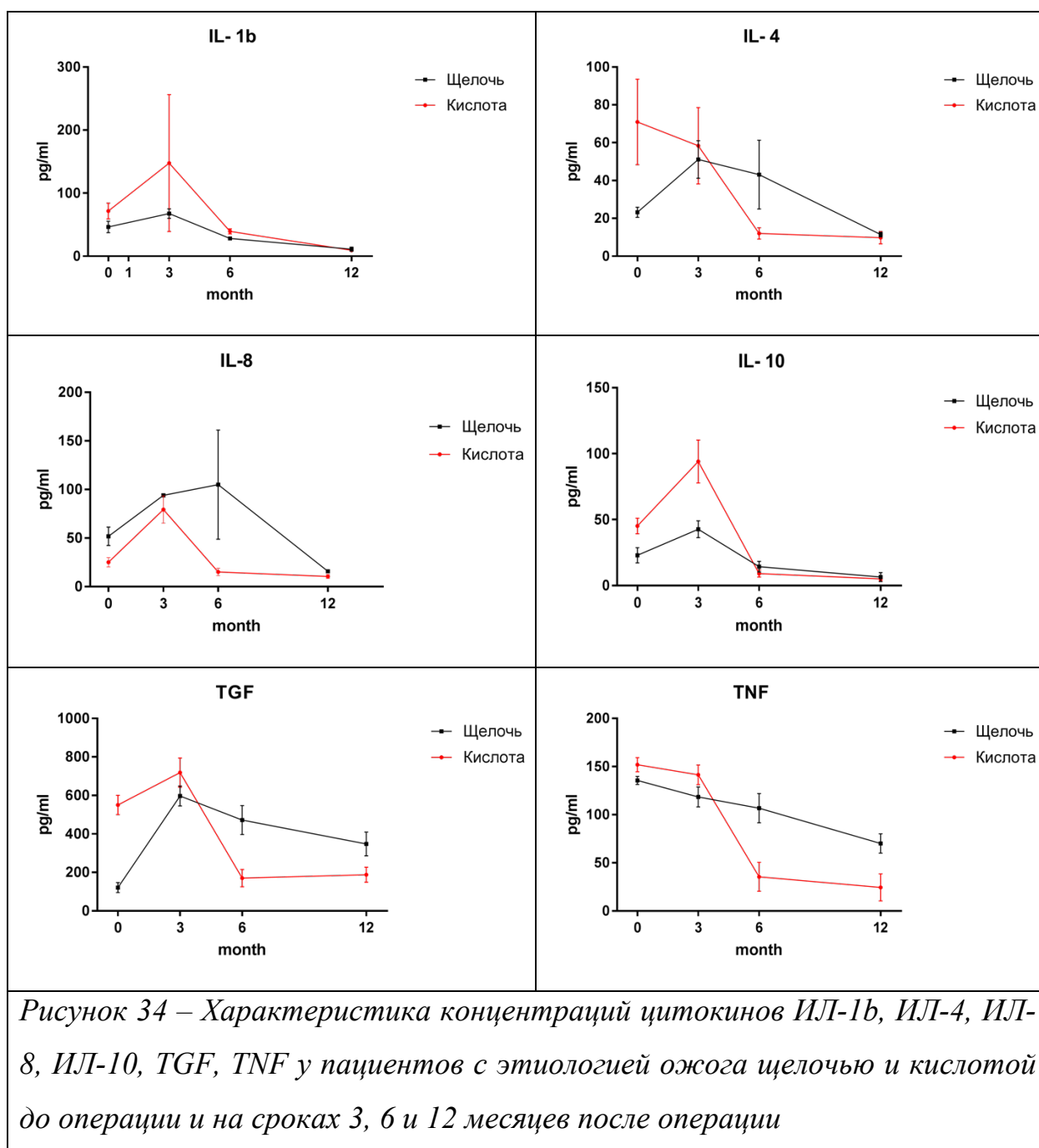


Таблица 13 – Характеристика подъема и снижения цитокинов в обеих группах в зависимости от срока.

	Группа 1 Полный СЛН (n=5)	Группа 2 Неполный СЛН (n=6)
ИЛ-8	Плавное снижение	Плавное снижение
ИЛ-4	Подъем к 3 месяцу, затем снижение	Плавное снижение

ИЛ-1b	Подъем к 3 месяцу, затем снижение	Плавное снижение
ИЛ-10	Подъем к 3 месяцу, затем снижение	Подъем к 3 месяцу, затем снижение
TGF-β	Подъем к 1 месяцу, затем снижение к 3 с подъемом к 6 и дальнейшему снижению	Плавное снижение
TNF-a	Подъем к 3 месяцу, затем снижение	Подъем к 3 месяцу, затем снижение

Таблица 14 – Вариабельность уровня цитокинов в образцах слез пациентов с полным и не полным СЛН (после G-SLET) на сроках до, 3, 6 и 12 месяцев (pg/mL).

Цитокин	Не полный СЛН (n=5)				Полный СЛН (n=6)			
	до	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	до	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев
ИЛ-8	162.32+/-79.9 (p=0.9998)	124+/-29.5 (p=0.9829)	47.65 +/-13.73 (p=0.0011)	30.8 +/-10.03 (p=0.041)	158.80 +/-24 (p=0.9998)	115.22+/-25.25 (p=0.9829)	104.93 +/-2.,6 (p=0.0011)	70.93 +/-15.4 (p=0.041)
ИЛ-4	78.173 +/- 20.95 <0.0001	51.488 +/- 19.05 (p<0.0001)	19.824 +/- 3.57 (p<0.0001)	17.37 +/- 5.91 (p=0.9536)	34.584 +/- 6.07 (p<0.0001)	80.011 +/- 8.72 (p<0.0001)	69.261 +/- 2.33 (p<0.0001)	21.455 +/- 3.64 (p=0.9536)
ИЛ-1β	93.20+/-14.52 (p=0.1035)	57.271+/- 50.47 (p<0.0001)	10.106+/-3.59 (p=0.981)	6.00+/-1.76 (p=0.9462)	128.00+/- 57.88 (p=0.1035)	173.512+/-27.71 (p<0.0001)	19.1+/-2.88 (p=0.981)	17.48+/-5.37 (p=0.9462)
ИЛ-10	27.16+/-5.09 (p=0.007)	39.648+/- 17.51 (p<0.0001)	13.7+/-2.98 (p=0.2008)	3.28+/-1.26 (p=0.991)	41.96+/-11.99 (p=0.007)	84.847+/- 21.74 (p<0.0001)	22.884+/-5.43 (p=0.2008)	5.588+/-2.27 (p=0.991)
TGF-β	1642.24+/- 976.47 (p<0.0001)	619.05+/- 303.36 (p=0.9942)	92.193+/-36.28 (p=0.0108)	64.868+/- 39.64 (p=0.9997)	465.89+/- 106.56 (p<0.0001)	524.626+/-88.78 (p=0.9942)	733.645+/- 72.80 (p=0.0108)	116.276+/-50.13 (p=0.9997)
TNF-α	136.80+/- 22.22 (p<0.0001)	381.113+/- 96.85 (p=0.0031)	106.481+/- 37.42 (p<0.0001)	79.61+/- 31.11 (p=0.2481)	411.16+/- 102.31 (p<0.0001)	501.6+/-52.43 (p=0.0031)	479.7+/-68.71 (p<0.0001)	145.599+/-49.28 (p=0.2481)

Таблица 15 – Корреляционный анализ цитокинов в предоперационном периоде у пациентов с не полным и полным СЛН (pg/mL).

Цитокин	Не полный СЛН (n=5)							Полный СЛН (n=6)					
	ИЛ-8	ИЛ-4	ИЛ-1 β	ИЛ-10	TGF- β	TNF- α		ИЛ-8	ИЛ-4	ИЛ-1 β	ИЛ-10	TGF- β	TNF- α
ИЛ-8		0.74 (p=0.014)	-0.25 (p=0.489)	0.04 (p=0.918)	0.45 (p=0.191)	0.32 (p=0.363)	ИЛ-8		1.00 (p=0.000)	0.35 (p=0,326)	-0.98 (p=0.000)	-0.04 (p=0.910)	-0.23 (p=0.523)
ИЛ-4	0.74 (p=0.014)		0.08 (p=0.833)	0.15 (p=0.683)	0.68 (p=0.032)	0.02 (p=0.962)	ИЛ-4	1.00 (p=0.000)		0.35 (p=0,316)	-0.99 (p=0.000)	-0.03 (p=0.927)	-0.21 (p=0.561)
ИЛ-1β	-0.25 (p=0.489)	0.08 (p=0.833)		-0.07 (p=0.846)	-0.43 (p=0.213)	0.11 (p=0.630)	ИЛ-1β	0.35 (p=0.326)	0.35 (p=0.316)		-0.37 (p=0.297)	0.57 (p=0.086)	-0.23 (p=0.523)
ИЛ-10	0.04 (p=0.918)	0.15 (p=0.683)	-0.07 (p=0.846)		0.18 (p=0.610)	0.11 (p=0.761)	ИЛ-10	-0.98 (p=0.000)	-0.99 (p=0.000)	-0.37 (p=0.297)		0.01 (p=0.978)	0.14 (p=0.690)
TGF-β	0.45 (p=0.191)	0.68 (p=0.032)	-0.43 (p=0.213)	0.18 (p=0.610)		-0.10 (p=0.782)	TGF-β	-0.04 (p=0.910)	-0.03 (p=0.927)	0.57 (p=0.086)	0.01 (p=0.978)		-0.15 (p=0.683)
TNF-α	0.32 (p=0.363)	0.02 (p=0.962)	0.17 (p=0,630)	0.11 (p=0.761)	-0.10 (p=0.782)		TNF-α	-0.23 (p=0.523)	-0.21 (p=0,561)	-0.23 (p=0.523)	0.14 (p=690)	-0.15 (p=0.683)	

Таблица 16 – Корреляционный анализ цитокинов в послеоперационном периоде на сроке 3 месяца у пациентов с не полным и полным СЛН (pg/mL).

Цитокин	Не полный СЛН (n=5)							Полный СЛН (n=6)					
	IL-8	IL-4	IL-1 β	IL-10	TGF- β	TNF- α		IL-8	IL-4	IL-1 β	IL-10	TGF- β	TNF- α
IL-8		0.99 (p=0.000)	0.92 (p=0.000)	0.35 (p=0.324)	0.98 (p=0.000)	0.74 (p=0.015)	IL-8		-0.30 (p=0.395)	0.07 (p=0.838)	-0.27 (p=0.455)	0.25 (p=0.493)	-0.28 (p=0.440)
IL-4	0.99 (p=0.000)		0.90 (p=0.000)	0.31 (p=0.386)	0.99 (p=0.000)	0.68 (p=0.030)	IL-4	-0.30 (p=0.395)		0.00 (p=0.997)	0.49 (p=0.148)	-0.38 (p=0.274)	0.16 (p=0.665)
IL-1β	0.92 (p=0.000)	0.90 (p=0.000)		0.55 (p=0.100)	0.85 (p=0.002)	0.53 (p=0.114)	IL-1β	0.07 (p=0.838)	0.00 (p=0.997)		-0.64 (p=0.045)	-0.02 (p=0.953)	-0.27 (p=0.444)
IL-10	0.35 (p=0.324)	0.31 (p=0.386)	0.55 (p=0.100)		0.26 (p=0.462)	0.24 (p=0.511)	IL-10	-0.27 (p=0.455)	0.49 (p=0.148)	-0.64 (p=0.045)		-0.53 (p=0.116)	0.26 (p=0.460)
TGF-β	0.98 (p=0.000)	0.99 (p=0.000)	0.85 (p=0.002)	0.26 (p=0.462)		0.73 (p=0.017)	TGF-β	0.25 (p=0.493)	-0.38 (p=0.274)	-0.02 (p=0.953)	-0.53 (p=0.116)		-0.52 (p=0.122)
TNF-α	0.74 (p=0.015)	0.68 (p=0.030)	0.53 (p=0.114)	0.24 (p=0.511)	0.73 (p=0.017)		TNF-α	-0.28 (p=0.440)	0.16 (p=0.665)	-0.27 (p=0.444)	0.26 (p=0.460)	-0.52 (p=0.122)	

Таблица 17 – Корреляционный анализ цитокинов в послеоперационном периоде на сроках 6 месяцев у пациентов с не полным и полным СЛН (pg/mL).

Цитокин	Не полный СЛН (n=5)							Полный СЛН (n=6)					
	IL-8	IL-4	IL-1 β	IL-10	TGF- β	TNF- α		IL-8	IL-4	IL-1 β	IL-10	TGF- β	TNF- α
IL-8		0.97 (p=0.000)	0.33 (p=0.348)	0.09 (p=0.815)	0.93 (p=0.000)	0.83 (p=0.003)	IL-8		-0.85 (p=0.002)	-0.27 (p=0.456)	-0.32 (p=0.367)	-0,35 (p=0.319)	0.09 (p=0.796)
IL-4	0.97 (p=0.000)		0.33 (p=0.351)	0.25 (p=0.479)	0.99 (p=0.000)	0.88 (p=0.001)	IL-4	-0.85 (p=0.002)		0.13 (p=0.712)	0.51 (p=0.132)	-0.14 (p=0.702)	-0.10 (p=0.781)
IL-1β	0.33 (p=0.348)	0.33 (p=0.351)		-0.42 (p=0.226)	0.32 (p=0.363)	0.16 (p=0.654)	IL-1β	-0.27 (p=0.456)	0.13 (p=0.712)		0.59 (p=0.072)	0.54 (p=0.105)	-0.82 (p=0.004)
IL-10	0.09 (p=0.815)	0.25 (p=0.479)	-0.42 (p=0.226)		0.32 (p=0.363)	0.42 (p=0.231)	IL-10	-0.32 (p=0.367)	0.51 (p=0.132)	0.59 (p=0.072)		-0.01 (p=0.976)	-0.48 (p=0.156)
TGF-β	0.930 (p=0.000)	0.99 (p=0.000)	0.32 (p=0.363)	0.32 (p=0.363)		0.89 (p=0.001)	TGF-β	-0.35 (p=0.319)	-0.14 (p=0.702)	0.54 (p=0.105)	-0.01 (p=0.976)		-0.32 (p=0.362)
TNF-α	0.83 (p=0.003)	0.88 (p=0.001)	0.16 (p=0.654)	0.42 (p=0.231)	0.89 (p=0.001)		TNF-α	0.09 (p=0.796)	-0.10 (p=0.781)	-0.82 (p=0.004)	-0.48 (p=0.156)	-0.32 (p=0.362)	

Таблица 18 – Корреляционный анализ цитокинов в послеоперационном периоде на сроке 12 месяцев у пациентов с не полным и полным СЛН (pg/mL).

Цитокин	Не полный СЛН (n=5)							Полный СЛН (n=6)					
	IL-8	IL-4	IL-1 β	IL-10	TGF- β	TNF- α		IL-8	IL-4	IL-1 β	IL-10	TGF- β	TNF- α
IL-8		1.00 (p=0.000)	-0.05 (p=0.890)	0.39 (p=0.267)	0.91 (p=0.000)	0.84 (p=0.002)	IL-8		0.67 (p=0.034)	0.22 (p=0.536)	0.31 (p=0.383)	0.82 (p=0.004)	0.03 (p=0.930)
IL-4	1.00 (p=0.000)		-0.04 (p=0.914)	0.38 (p=0.281)	0.90 (p=0.000)	0.85 (p=0.002)	IL-4	0.67 (p=0.034)		0.62 (p=0.057)	0.46 (p=0.177)	0.96 (p=0.000)	-0.08 (p=0.828)
IL-1β	-0.05 (p=0.890)	-0.04 (p=0.914)		-0.22 (p=0.534)	-0.15 (p=0.672)	0.04 (p=0.912)	IL-1β	0.22 (p=0.536)	0.62 (p=0.057)		0.58 (p=0.079)	0.61 (p=0.062)	-0.05 (p=0.892)
IL-10	0.39 (p=0.267)	0.38 (p=0.281)	-0.22 (p=0.534)		0.41 (p=0.241)	0.29 (p=0.409)	IL-10	0.31 (p=0.383)	0.46 (p=0.117)	0.58 (p=0.079)		0.49 (p=0.155)	0.14 (p=0.706)
TGF-β	0.91 (p=0.000)	0.90 (p=0.000)	-0.15 (p=0.672)	0.41 (p=0.241)		0.67 (p=0.035)	TGF-β	0.82 (p=0.004)	0.96 (p=0.000)	0.61 (p=0.062)	0.49 (p=0.155)		0.00 (p=0.994)
TNF-α	0.84 (p=0.002)	0.85 (p=0.002)	0.04 (p=0.912)	0.29 (p=0.409)	0.67 (p=0.409)		TNF-α	0.03 (p=0.930)	-0.08 (p=0.828)	-0.05 (p=0.892)	0.14 (p=0.706)	0.00 (p=0.994)	

**Петри А., Сэбин К.; Пер. с англ.; Под ред. В.П. Леонова. Наглядная медицинская статистика. Учебное пособие.

Изд. ГЭОТАР-Медиа, 2019 г.

Таким образом 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, но не на высоком уровне активности. Фактор роста фибробластов TGF- β на всех этапах исследования в послеоперационном периоде по своей активности соответствовал клиническими симптомам истинного приживления лимбальных аутотрансплантатов при отсутствии активности процесса ре-моделирования. Подъем изучаемых интерлейкинов 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. Между ИЛ-1 и ИЛ-10 не было найдено взаимосвязи. Следует отметить, что и тот и другой цитокин в обеих группах имел одинаковую тенденцию подъема к 3 месяцу после операции, а затем плавное снижение.

При сопоставлении цитокинового профиля СЖ с этиологическим фактором СЛН было выявлено, что при постожоговом СЛН кислотного генеза концентрация изучаемых 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 (рисунок 34). При этом у пациентов с постожоговым СЛН щелочного генеза уровень провоспалительных цитокинов к 6-му месяцу – возрастал, а в последующем крайне незначительно снижался. 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.

ГЛАВА 5. КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ОДНОСТОРОННИМ СЛН.

В данной главе подробно описаны методы хирургического лечения и представлены клиничко-функциональные результаты лечения пациентов (n=24) на сроках 6 и 12 месяцев. Все представленные операции были выполнены одним хирургом (д.м.н., профессор, член-корр. РАН Малюгин Б.Э.) на базе Отдела оптико-реконструктивной и трансплантационной хирургии ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

5.1. 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 №19):

Таблица 19 – Распределение пациентов в зависимости от типа хирургического вмешательства.

Бесклеевая лимбальная эпителиальная трансплантация (G-SLET) <i>(с англ. 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 <i>(с англ. Femtosecond</i> <i>laser assisted) +</i> микробор + МКЛ n=8	Передняя послойная кератопластика ALK + G-SLET <i>(с англ. anterior lamellar</i> <i>keratoplasty) + микробор</i> + МКЛ n=5

Хирургические вмешательства были выполнены в плановом порядке, одним хирургом. Часть операций были произведены под местной/проводниковой анестезией (n=21), часть – под общим эндотрахеальным наркозом у детей (n=3).

Общими этапами для всех видов хирургического вмешательства являлись:

На глазу-реципиенте (пораженном):

1) Обработка операционного поля осуществлялась стандартным методом для всех пациентов: веки 10%, а конъюнктивальную полость - 5% раствором бетадина. Анестезиологическое пособие включало ретробульбарную анестезию 2% раствором наропина (2,0 мл);

2) Отсечение конъюнктивы от лимба (перитомия) по всей окружности -360° градусов, и её отслаивание на 5-10 мм за пределы лимба, с последующей фиксацией на этом расстоянии узловыми швами к склере (викрил 8-0);

3) Полное иссечение фибро-вазкулярной ткани роговицы (при неполном СЛН оставляя интактным участок неизменённого эпителия);

4) В ряде случаев (n=17) пациентам выполнялось предварительное выравнивание (шлифование) поверхности роговицы при помощи алмазного 0,5 мм микробора (Algebrush II 0.5mm burr, США). Данный способ хирургического лечения защищен патентом РФ №2752547;

5) Формирование роговичных туннелей по периферии роговицы на глубину 150-350 мкм, протяженностью 2,5 - 3,0 мм;

6) Имплантация ауто-трансплантатов по одному фрагменту в туннель.

На глазу-доноре (здоровом):

1) Иссечение прямоугольного фрагмента лимба на 12 часах размерами 1,5-2,0 мм шириной и 2,5-3,0 мм длиной, с разделением его на 8-10 равных фрагментов;

2) Наложение двух узловых конъюнктивно-роговичных швов на место биопсии (викрил 8-0);

В качестве защитного покрытия пришивали криоконсервированную чАМ и накладывали МКЛ или только МКЛ на 14 дней. В послеоперационном периоде пациентам назначали инстилляцию капель - в течение первых двух недель в оба глаза антибиотик (Sol. Levofloxacini 0,005%) 3 раза в день, глюкокортикостероид (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. При необходимости назначались репаратанты (Gel. Dexpanthenoli 5%) 2-3 раза в день.

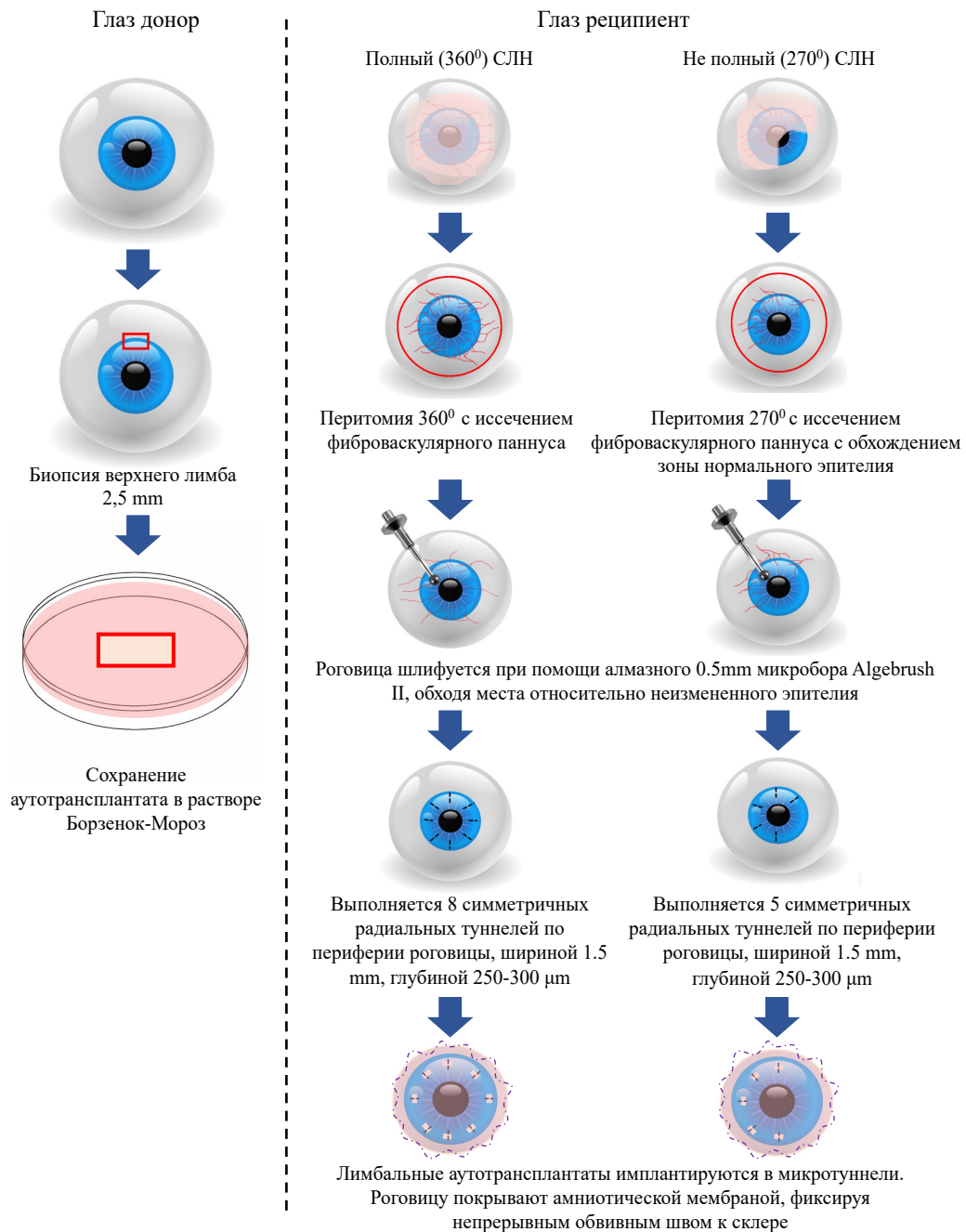


Рисунок 35 – Схема выполнения бесклеевой лимбальной эпителиальной трансплантации с предварительным выравниванием глазной поверхности и биологическим покрытием роговицы при полном и неполном СЛН в мануальной технике.

По мере накопления клинического материала, мы стали нередко сталкиваться со случаями истончения роговицы у пациентов с СЛН. Это обстоятельство значительно усложняло проведение лимбальной кератопластики по мануальной технологии ввиду большого риска перфорации в момент формирования туннелей и имплантации фрагментов лимба в карманы. В ряде случаев вовсе отсутствовала возможность формирования туннелей на периферии роговицы. В 2021 году нашей научной группой совместно с инженерами Ziemer ophthalmic Systems (Швейцария), на платформе низкоэнергетического фемтосекундного лазера LDV Z8, впервые в мире разработан алгоритм и программное обеспечение для выполнения G-SLET.

Техника восстановления эпителиального слоя роговицы с применением низкоэнергетического фемтосекундного лазера

При данной технологии на глазу-реципиенте после проведения общих этапов 1-4, описанных в начале данной главы, производили фиксацию вакуумного кольца к поверхности пораженного глаза и присоединяли к нему головку лазера. Диаметр аппланации составлял от 8,5 до 10,0 мм. Далее производили сканирование роговицы с помощью встроенной в лазер ОКТ, уточняли места расположения, глубину и конфигурацию туннельных разрезов. Ориентацию туннелей можно было менять с помощью встроенного программного обеспечения, таким образом они могли быть ориентированы как тангенциально, так и радиально (в диапазоне 0-90 градусов). Длина туннеля, как и длина разреза, составляют 1,0 мм, его ширина 0,5 мм, общее количество тоннелей 8, глубина 150-300 мкм (таблица №20). После

проведения резекции на заданные параметры дезактивировали вакуум и отсоединяли головку лазера с вакуумным кольцом от роговицы. Далее осуществляли забор трансплантата с глаза-донора и имплантировали по одному фрагменту лимба в туннель на глазу-реципиенте. Склеральную часть лимбального фрагмента располагали в глубине туннеля, а роговичную часть - ближе к поверхности. При этом, фрагмент лимба немного выступал над поверхностью роговицы. Стоит отметить, что встроенное в микроскоп интраоперационное ОКТ дает возможность дополнительного контроля гладкости поверхности роговицы и остаточной толщины, состоятельность туннелей, их глубину и положение ауто трансплантатов в туннелях. Данный способ хирургического лечения защищен патентом РФ № 2769068.

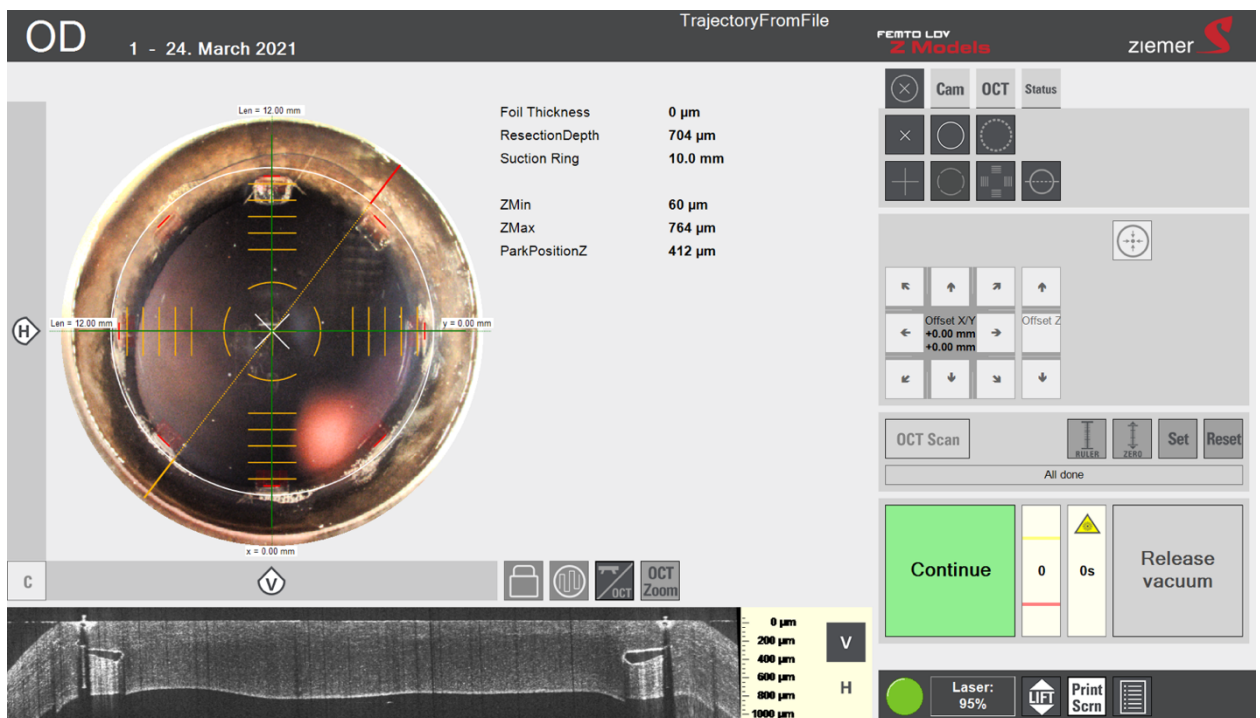


Рисунок 36 – Скриншот с экрана фемтосекундного лазера LDV Z8 после формирования туннелей. Видна аппланация лазера с роговицей (плоский интерфейс) и сформированными тангенциально ориентированным $n=8$ туннелями по периферии роговицы. Контроль встроенной в лазер интраоперационной ОКТ, с вертикальным сканированием роговицы, диаметр аппланационного кольца 10.0, глубина вертикального реза составила 300 мкм.

Таблица 20 – Варианты траекторий для выполнения туннелей роговицы при проведении FS G-SLET.

Параметр	Единица измерения	Минимум	Максимум	Шаг	Количество
Глубина туннелей	мкм	150	300	50	4
Диаметр периферического кольца	мм	8,5	9,5	0,5	3
Количество туннелей	-	6	10	1	5
Ширина туннелей	мм	0,5	0,5	0,1	1
Длина туннелей	мм	1	1	0,1	1
Общее количество траекторий	-				60

Преимущества использование ФСЛ:

- Возможность изменения положения, длины, ширины, глубины и количества туннелей (более 60 вариантов траекторий), что позволяет создавать кастомизированные туннели по необходимым для пациента параметрам;
- Показано для пациентов с истонченными роговицами, что существенно снижает риск перфорации на этапе формирования туннелей в сравнении с мануальной технологией;
 - Контроль при помощи встроенной ОКТ;
 - Возможность учета циклоторсии.

Преимущества технологии G-SLET:

1. Отсутствие реакция отторжения – так как производится пересадка аутологичных ЛСК;
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 (донора).

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

На глазу-реципиенте после проведения общих подготовительных этапов производят фиксацию вакуумного кольца на поверхности пораженного глаза и присоединяют к нему головку лазера (рисунок 37, С), диаметр аппланации может составлять от 8,5 до 10 мм, установленная глубина ламеллярного реза от 100 до 300 мкм. После проведения лазерной резекции по заданным параметрам, дезактивируют вакуум и отсоединяют головку лазера с вакуумным кольцом от роговицы, производят отслоение глубоких слоев роговицы от поверхностных (рисунок 37, D). В подготовленное операционное ложе укладывают донорскую роговицу, предварительно выкроенную лазером (рисунок 37, F) (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 (нейлон 10-0).

На глазу-доноре после проведения общих этапов 1-2 (забора лимбального фрагмента) (рисунок 37, G) и его деления на кусочки (рисунок 35, H) производят имплантацию аутооттрансплантатов по одному фрагменту в интерфейс между роговицей реципиента и донорским трансплантатом, в местах свободных от швов (рисунок 37, J). Данный способ хирургического лечения защищен патентом РФ № 2766166. При этом также возможно

формировать туннели как на периферии собственной роговицы, так и на донорском трансплантате при помощи ФСЛ. Данный способ хирургического лечения защищен патентом РФ № 2773134.

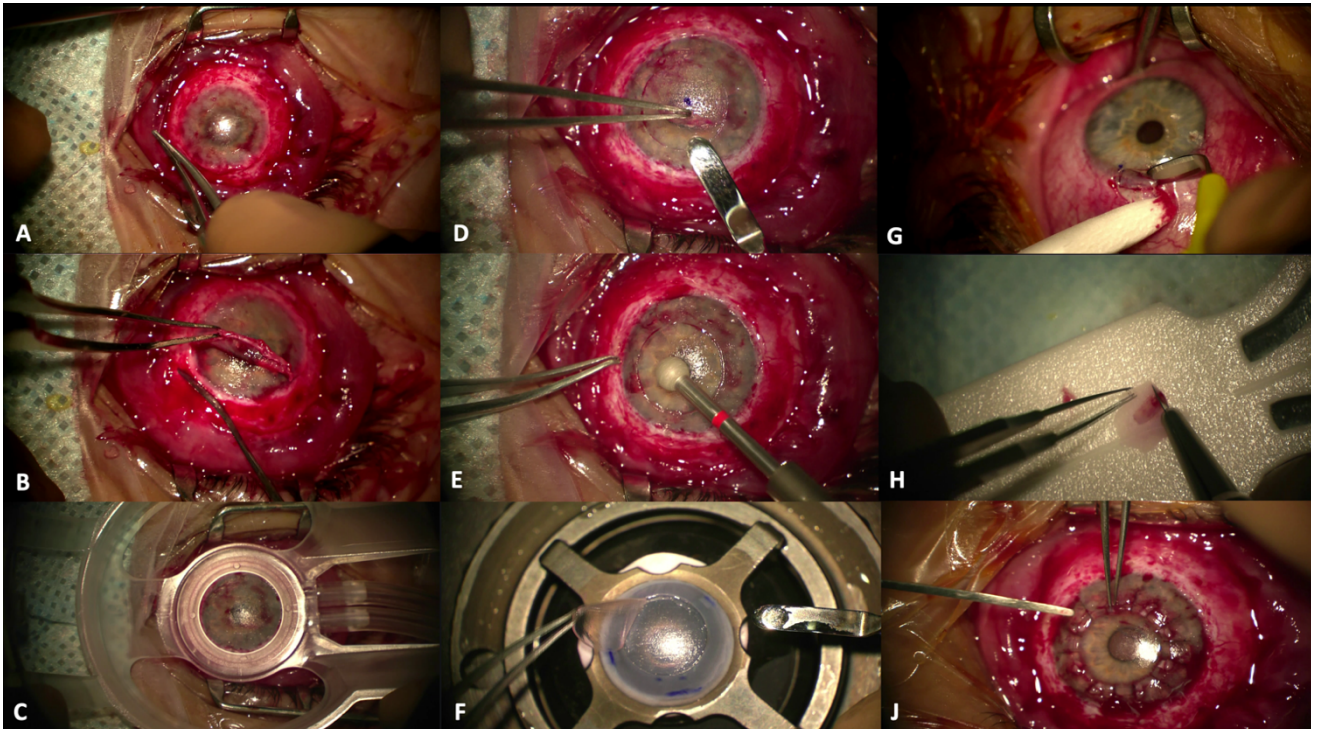


Рисунок 37. Схема техники фемтолазер-ассистированной передней послойной кератопластики с одномоментной трансплантацией фрагментов лимба: А- перитомия конъюнктивы на 360 градусов; В- удаление фиброваскулярного паннуса; С- аппланация вакуумного кольца к роговице глаза-реципиента; D – расслаивание глубоких слоев от поверхностных; Е-шлифовка роговицы при помощи микробора; F-выкраивание донорской роговицы; G-иссечение зоны лимба на глазу-доноре; H-фрагментация лимбального ауто трансплантата; J-имплантация полученных фрагментов в интерфейс между донорским трансплантатом и роговицей реципиента.

Преимущества технологии одномоментной ALK+G-SLET:

1. Быстрая эпителизация благодаря тому, что рост эпителия по неповрежденной БМ донорской роговицы происходит более полноценно и быстрее, чем по оголенной строме;

2. Высокий функциональный результат, что в ряде случаев исключает необходимость проведения второго этапа (СКП), при условии достижения высокой остроты зрения;

3. Отсутствие выбраковки ценного донорского материала, так как для проведения ALK обязательно использование донорского материала с высокими показателями плотности эндотелиальных клеток;

4. Возможность проведения этапов операции как мануально, так и с использованием ФСЛ и сформировать туннели как на роговице донора, так и на реципиенте;

5. В данной технологии возможно полностью исключить этап формирования туннелей, так как лимбальные аутотрансплантаты легко фиксируются в интерфейсе роговицы донор-реципиент, что значительно упрощает технику операции.

Таким образом, разработанные варианты хирургической техники аутотрансплантации фрагментов лимба G-SLET у пациентов с односторонним СЛН с использованием мануальных и фемтолазерных технологий являются эффективными и доступными для всеобщего применения. Использование ФСЛ стандартизирует операцию, делая ее более предсказуемой. Стоит учитывать все преимущества и недостатки каждой техники, технические возможности, опыт хирурга, а также проводить тщательный анализ клинико-функциональных результатов дооперационной диагностики для выбора более оптимальной тактики лечения.

5.2. Клинико-функциональные результаты пациентов в послеоперационном периоде.

Оценку клинических результатов производили по следующим критериям эффективности:

Первичные критерии эффективности: вероятность благоприятного исхода проведенного хирургического лечения основывалась на анализе клинико-функциональных показателей (см. главу 2, таблицу 7):

- Объективное исследование роговицы (бимокроскопия)
- Окрашивание роговицы нмФЛ для выявления стабильности эпителия на поверхности роговицы и отсутствие конъюнктивализации в оптической зоне по данным биомикроскопии и процентного анализа эпителизации (по данным программы Fiji ImageJ) к 6 и 12 месяцу после операции.
- Анализ ОКТ переднего отрезка
- Сроки зрительной реабилитации (МКОЗ)

В качестве благоприятного исхода приняли достижение эпителизации роговицы площадью в 100%. *Сомнительный исход лечения* – рецидив частичной конъюнктивализации и неоваскуляризации роговицы, не затрагивающие центральной 5 мм зоны роговицы, окрашивание эпителия. *Неблагоприятный исход лечения* – рецидив фиброваскулярного паннуса, вторгающегося в оптическую зону, рецидив(-ы) эрозии роговицы.

Результаты.



Рисунок 38 – Вероятность благоприятного исхода у пациентов с синдромом лимбальной недостаточности в исследуемой группе

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% по данным критериев клинико-функциональных показателей (рисунок 38).

До операции процент эпителизации роговицы составлял 0,001 (0,001;23,50). Через 6 и 12 месяцев после лечения отмечали стойкую эпителизацию роговицы 100 (47,50;100) и 100 (91,50;100), которые были статистически значимо выше соответствующих данных до лечения ($p < 0,001$, критерий Вилкоксона) (таблица 21, рисунок 39).

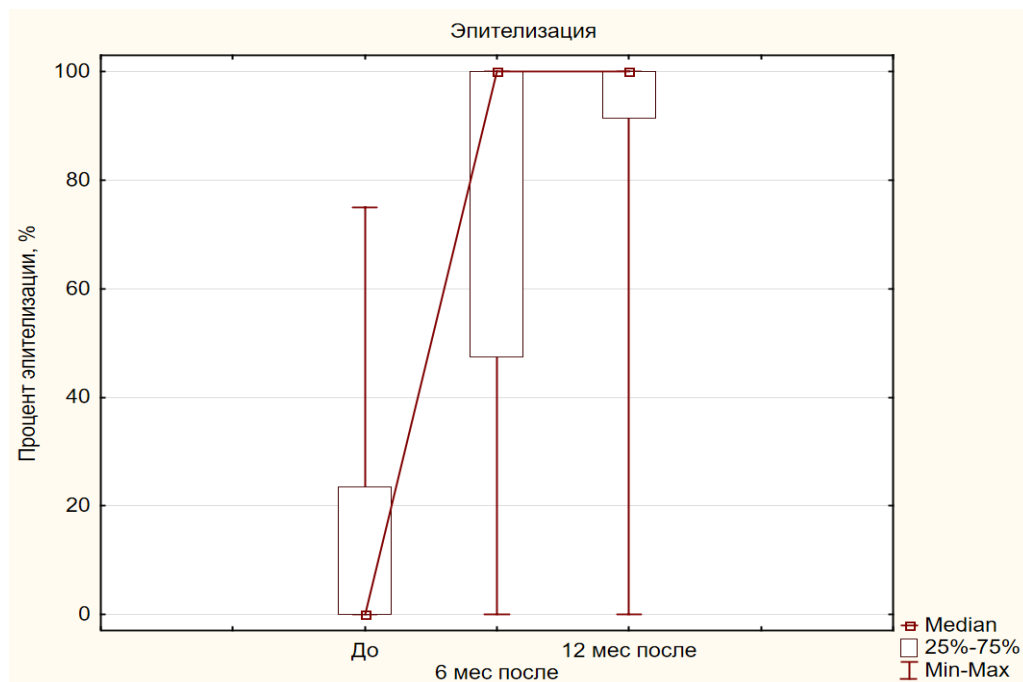


Рисунок 39 – Процентное соотношение эпителизации роговицы до и в различные сроки после операции.

Медианное значение МКОЗ изменилось с 0,01 (0,01; 0,04) в предоперационном периоде до 0,10 (0,03; 0,35) ($p < 0,001$) в первые полгода и достигло максимума к 12 месяцу послеоперационного наблюдения и составило 0,18 (0,03; 0,6). Острота зрения 0,2 и выше наблюдалась у 5

пациентов, а показатель равный 0,6 и выше наблюдали в 7 случаях. Подробные результаты МКОЗ на всех сроках наблюдения представлены в таблице 21, рисунок 40.

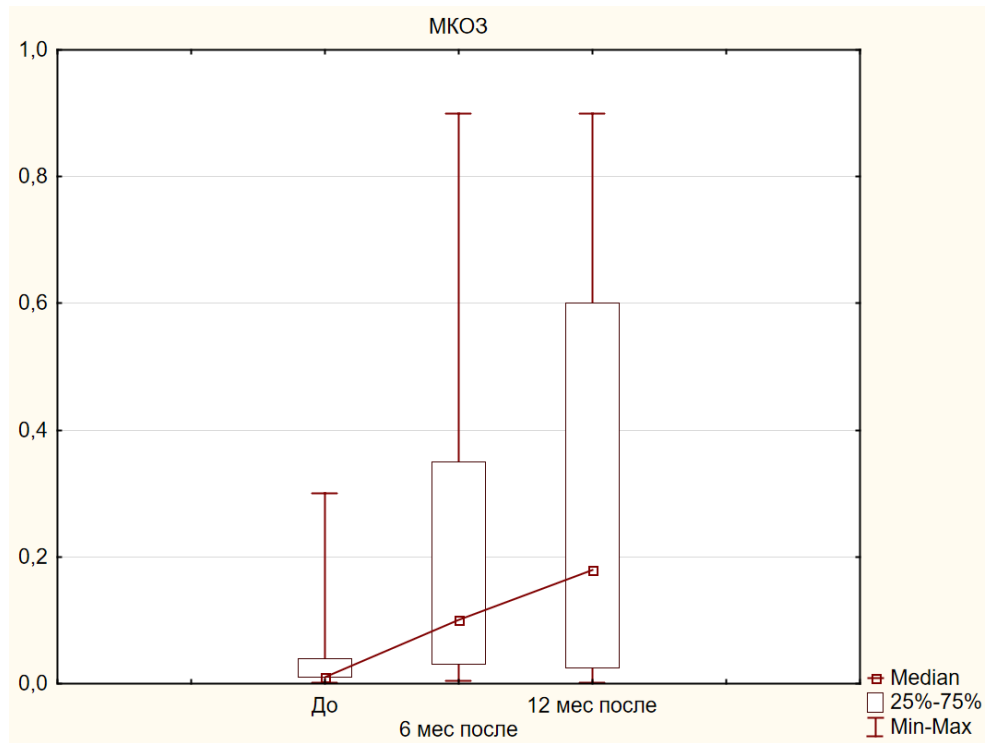
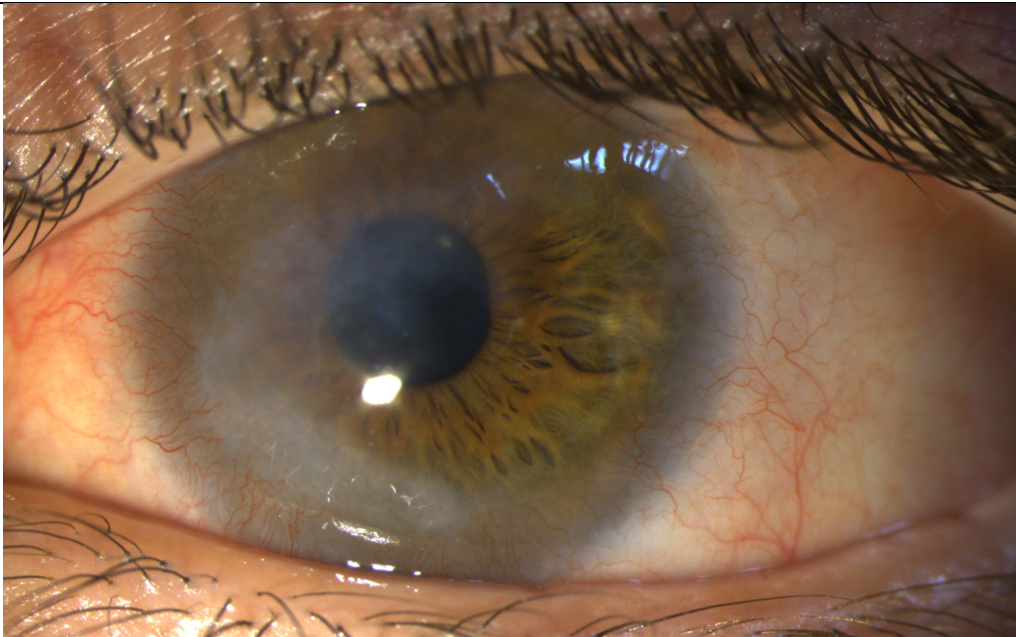


Рисунок 40 – МКОЗ до и в различные сроки после операции



А

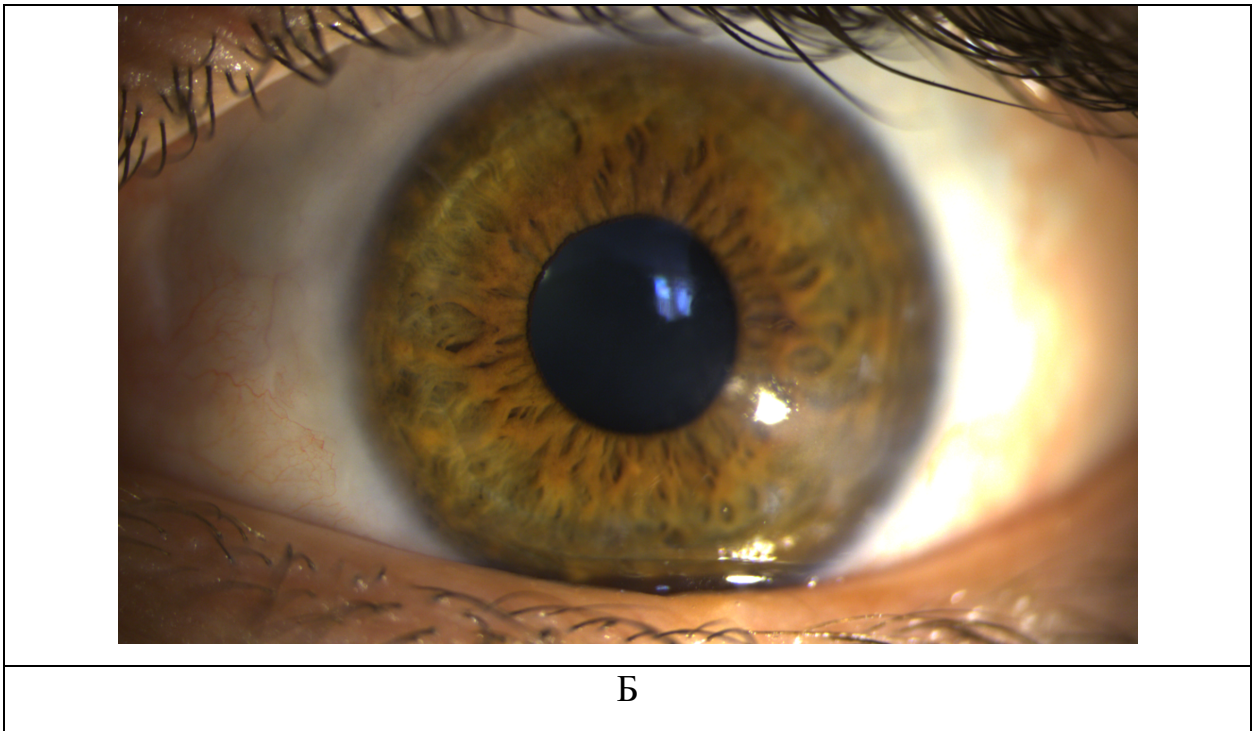


Рисунок 41 – Пример биомикроскопической картины пациента: А - с односторонним неполным СЛН до операции (периферическая конъюнктивализация роговицы, поверхностная васкуляризация, диффузные помутнения в поверхностных слоях стромы по периферии роговицы, парацентральный участок роговицы с носовой стороны интактен; Б - год после операции наблюдается стабильная эпителизация роговицы.

Вторичные критерии эффективности: экспертная оценка состояния роговицы (баллы от 0-3) проводили три независимых исследователя, при этом оценивали окрашивание эпителия, степень неоваскуляризации, конъюнктивализации и помутнений стромы (см. главу 2, таблица 8).

Результаты.

По экспертным данным окрашивания роговичного эпителия нмФЛ до операции показатель составил 2,17 (2,00;2,66), через 6 и 12 месяцев после операции составили 0,60 (0,00;1,47) и 0,60 (0,00;1,00) соответственно, были статистически значимо меньше соответствующих данных до лечения ($p < 0,001$, критерий Вилкоксона) (Таблица 21, Рисунок 42-43). Окрашивание

эпителия снизилось на 72,4% на сроках 6 и 12 месяцев соответственно по сравнению с дооперационными данными у 91,7% пациентов.

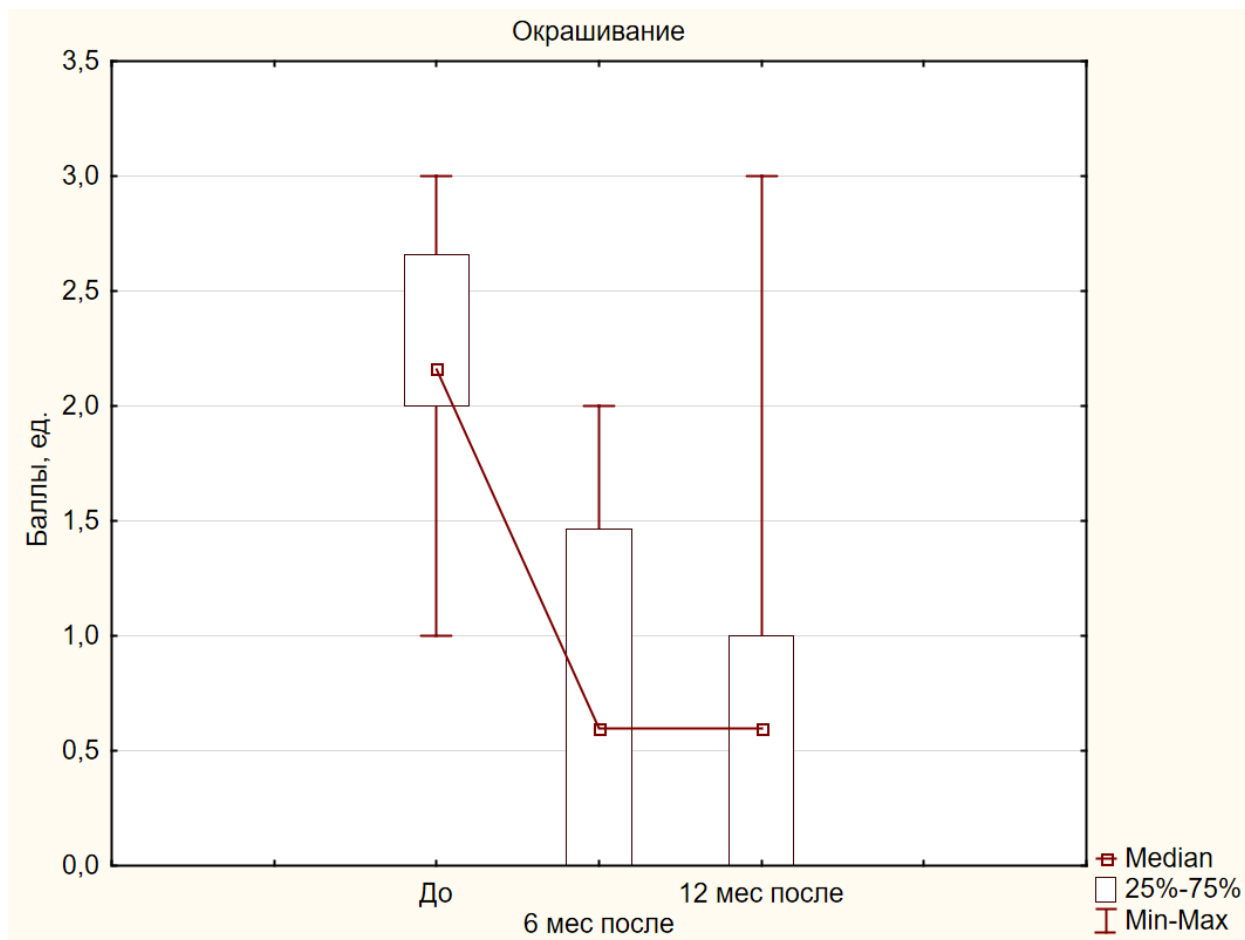


Рисунок 42 – Экспертная оценка окрашивания роговицы до и в различные сроки после операции

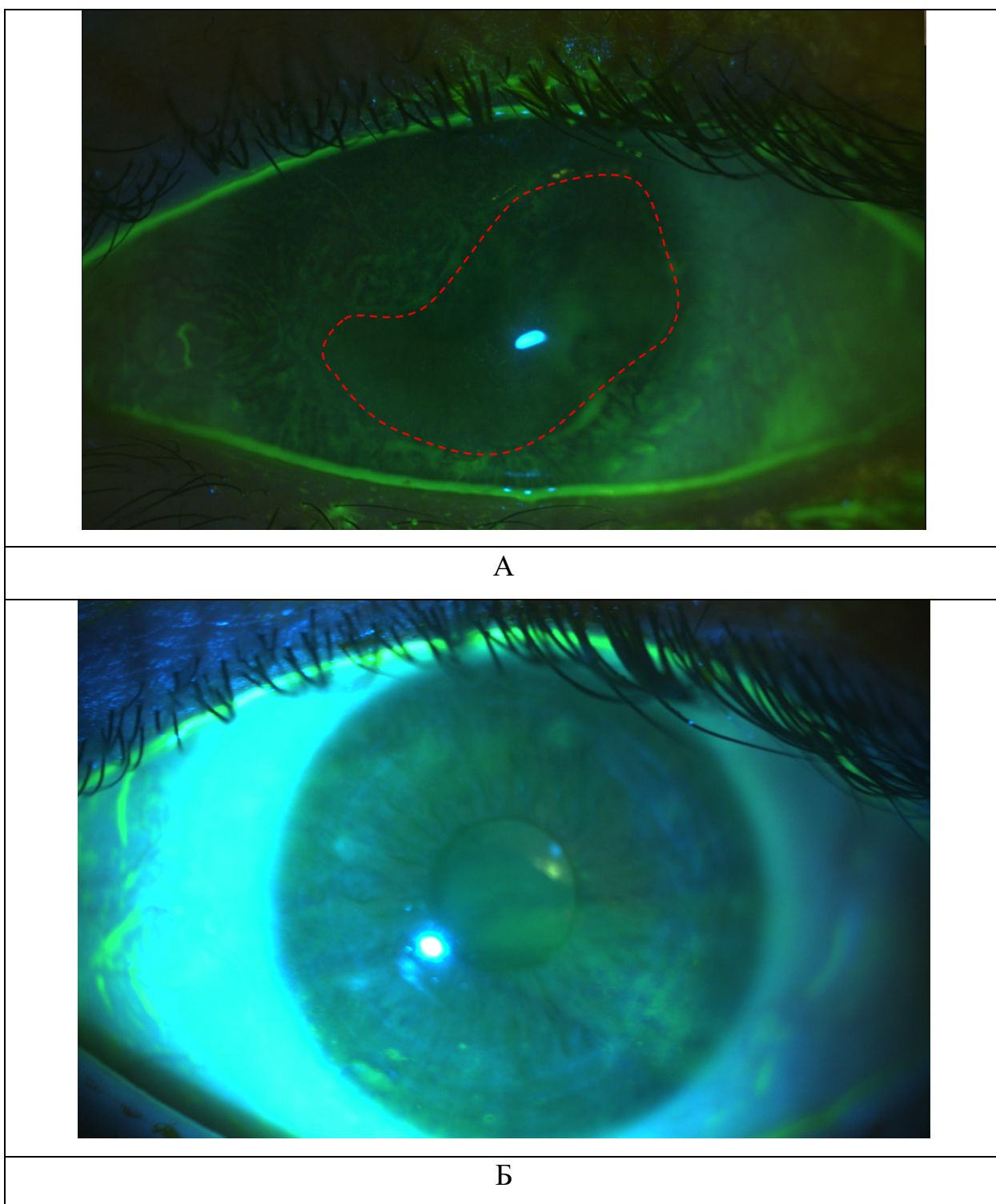


Рисунок 43 – Пример биомикроскопической картины роговицы с окрашиванием нмФЛ пациента: А с односторонним неполным СЛН до операции (красным пунктиром обозначена зона интактного эпителия, по периферии- зона конъюнктивализации роговицы; Б - год после операции наблюдается отсутствие окрашивания - полная эпителизация роговицы.

Данные экспертной оценки конъюнктивализации до операции составили 2,66(2,33;3,0), через 6 и 12 месяцев после операции 0,47 (0,00;1,15) и 0,33 (0,00;1,0) соответственно, и были статистически значимо меньше соответствующих данных до лечения ($p < 0,001$, критерий Вилкоксона) (таблица 21, рисунок 44). Конъюнктивализация в процентном перерасчете снизилась на 82,3% к 6 месяцам и на 87,6% к 12 месяцам по сравнению с дооперационными данными у 100% пациентов.

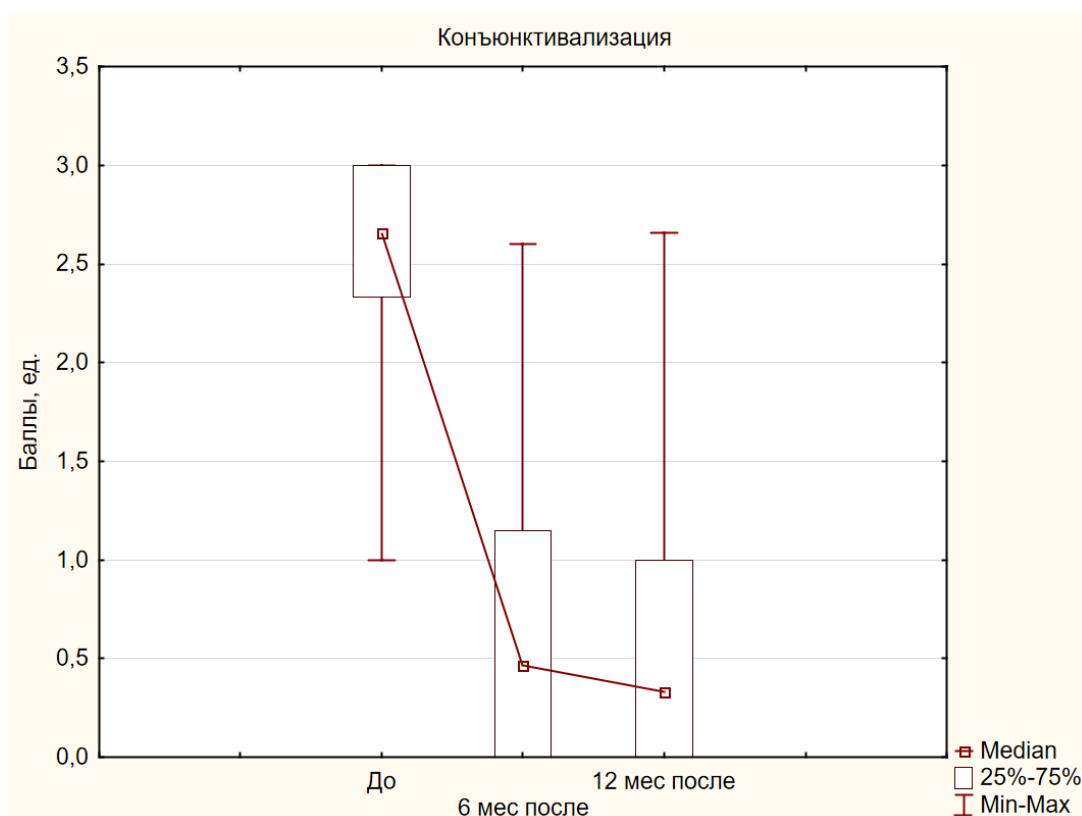


Рисунок 44 – Экспертная оценка конъюнктивализации до и в различные сроки после операции

Данные экспертной оценки неоваскуляризации до операции составили 2,66 (2,32; 3,00) через 6 и 12 месяцев после операции 1,00 (0,33; 1,33) и 1,15 (0,33; 2,00) соответственно, и были статистически значимо меньше соответствующих данных до лечения ($p < 0,001$, критерий Вилкоксона) (Таблица 21, Рисунок 45). Неоваскуляризация роговицы снизилась на 62,4% к

6 месяцам и на 56,8% к 12 месяцам по сравнению с дооперационными данными у 79,2% пациентов.

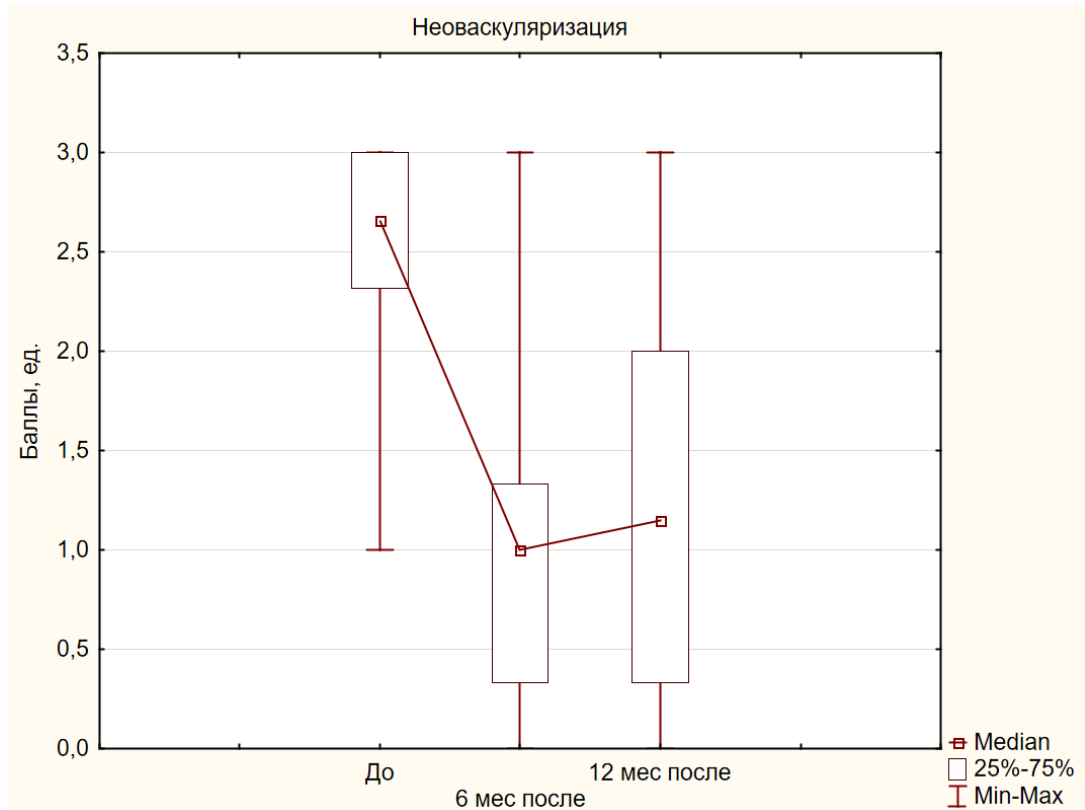


Рисунок 45 – Экспертная оценка неоваскуляризации роговицы до и в различные сроки после операции

Данные экспертной оценки помутнения роговицы до операции составили 2,15 (1,33;2,80), через 6 и 12 месяцев после операции полученные данные были сопоставимы 1,00 (0,33;1,60) и статистически значимо меньше соответствующих данных до лечения ($p < 0,001$, критерий Вилкоксона) (таблица 21, рисунок 46 и 47). Помутнение роговицы снизилось на 53% на сроках в 6 и 12 месяцев соответственно по сравнению с дооперационными данными у 87,5% пациентов.

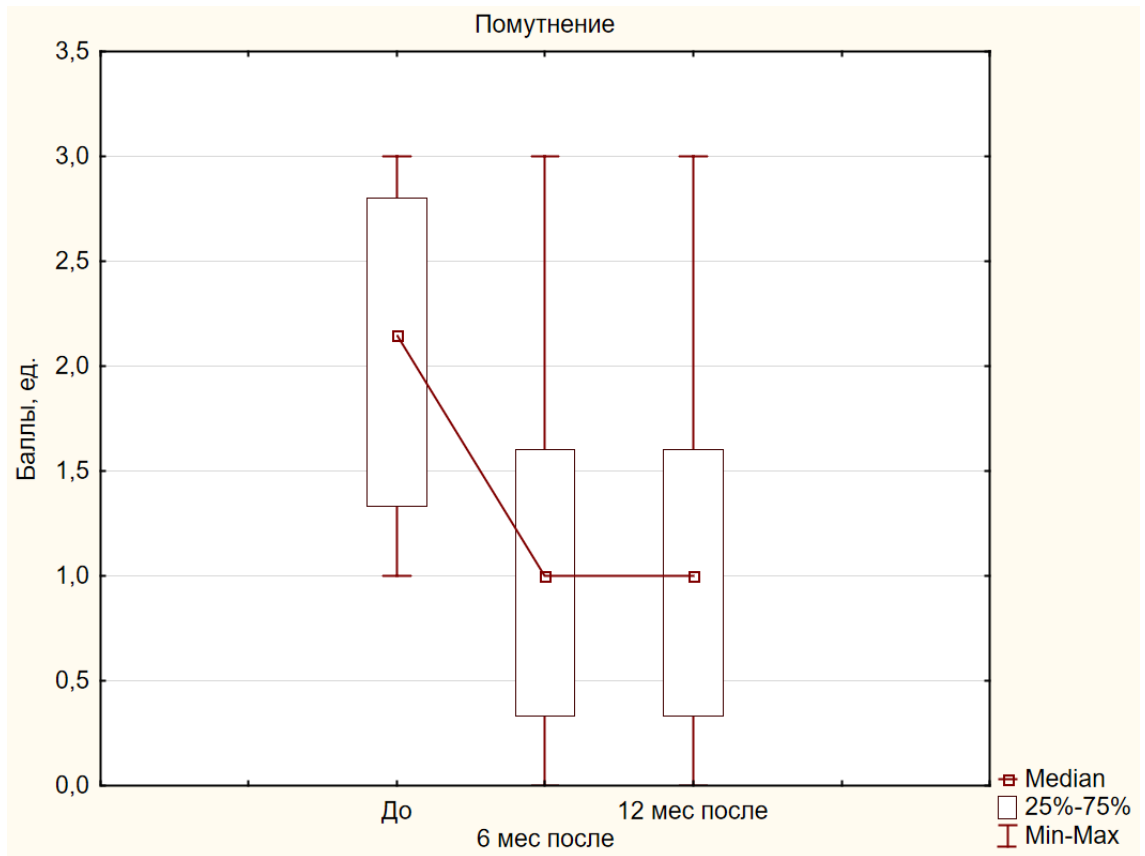
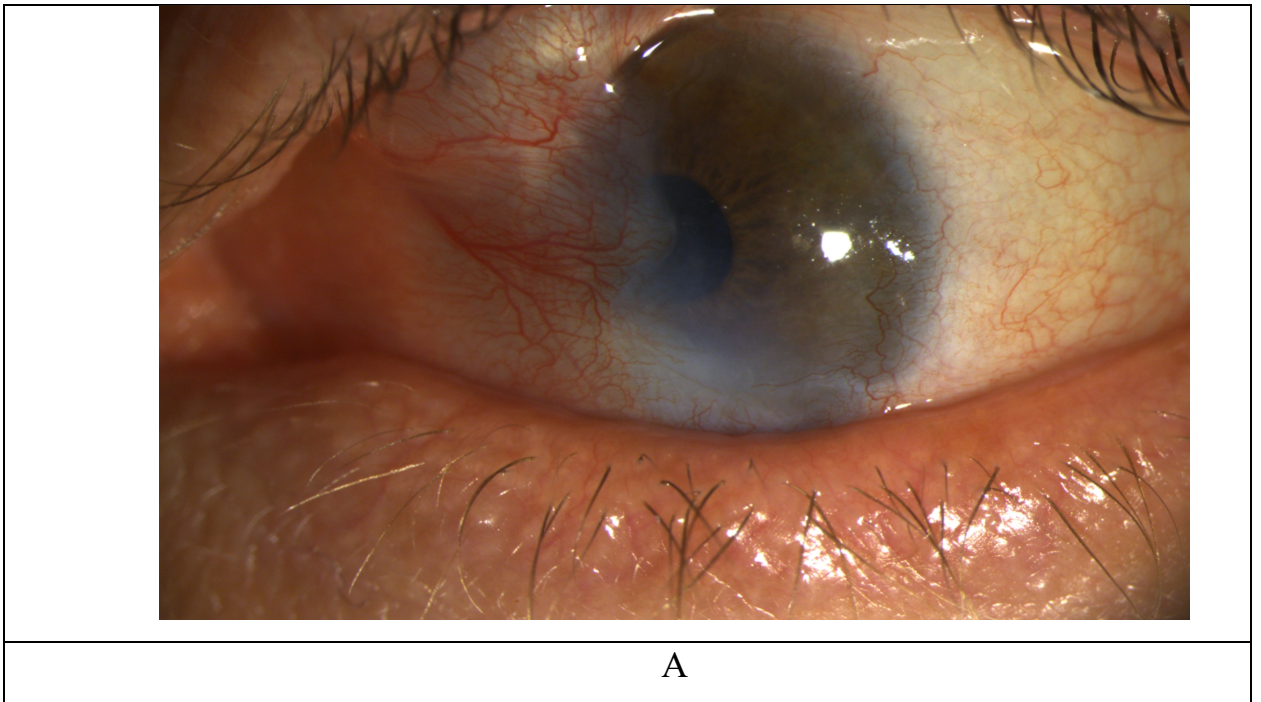


Рисунок 46 – Экспертная оценка помутнения роговицы до и в различные сроки после операции



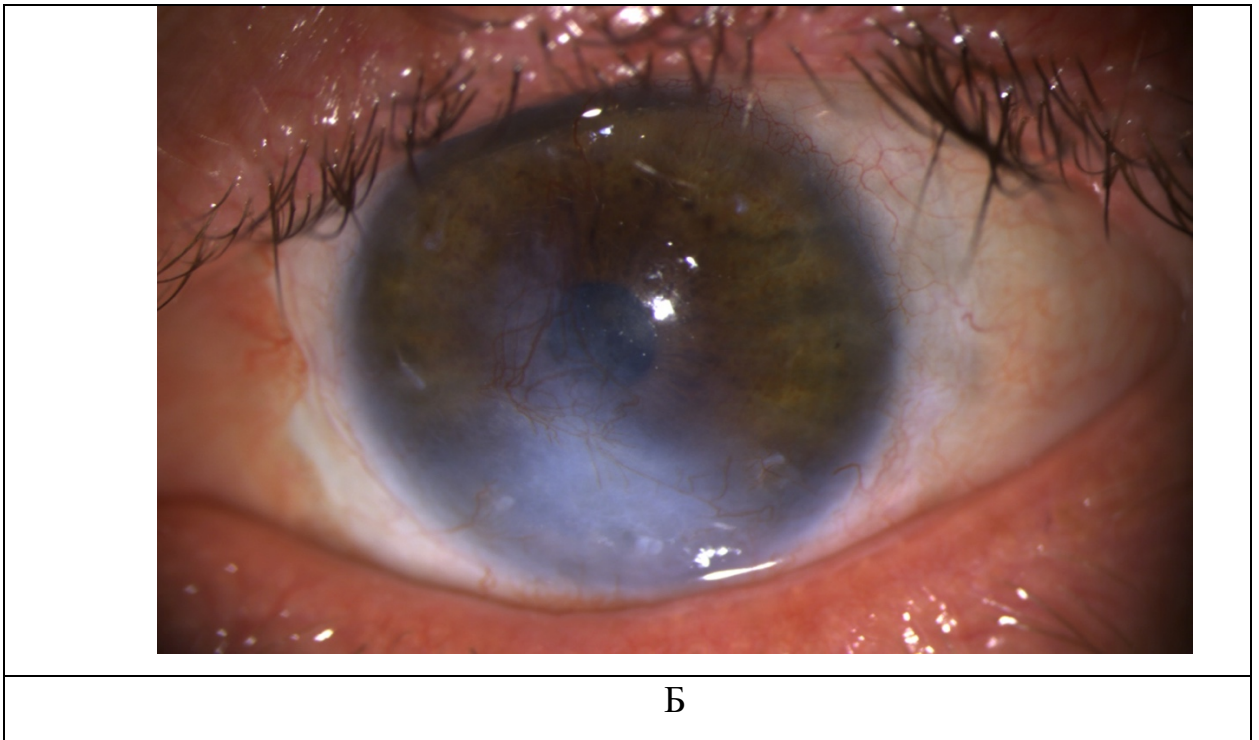


Рисунок 47 – Пример биомикроскопической картины роговицы пациента: А с односторонним неполным СЛН до операции (конъюнктивализация роговицы преимущественно в носовой части с захватом центральной оптической зоны, визуализируются диффузные глубокие помутнения стромы; Б - год после операции, наблюдается полная эпителизация роговицы, однако отмечается остаточное глубокое помутнение и васкуляризация преимущественно в центре и в нижних отделах роговицы.

Таблица – 21 Клинико-морфофункциональные результаты лечения пациентов с синдромом лимбальной недостаточности

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

Примечание. * - сравнение с данными до операции (критерий Вилкоксона)

Таким образом, предложенная технология хирургического лечения G-SLET на отдаленных сроках послеоперационного периода (6 и 12 месяцев) зарекомендовала себя как эффективная, способствующая в первую очередь реэпителизации роговицы технология. Благодаря анализу клинико-функциональных результатов (бимокроскопия роговицы, окрашивание глазной поверхности нмФЛ, ОКТ диагностика переднего отрезка глаза) вероятность благоприятного исхода к году после операции составила 75%, что полностью соответствовало первичному критерию эффективности. Сроки

зрительной реабилитации (МКОЗ) 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.

5.3. 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.

5.4. Алгоритм диагностики и хирургического лечения пациентов с односторонним СЛН

В данной главе подробно представлен и описан разработанный алгоритм диагностики для пациентов с односторонним СЛН основанный на динамическом наблюдении, ведении и оценке отдаленных клинико-функциональных результатов разработанных технологий лечения. Пошаговый алгоритм включает в себя ведение пациента от первичного обращения на поликлиническом этапе до проведения дополнительной диагностики и выбора конкретной тактики хирургического лечения.

На этапе обращения основными задачами врача офтальмолога являются:

Сбор жалоб пациента: при этом стоит особенно внимательно отнестись к пациентам с жалобами на постоянную или периодическую глазную боль,

слезотечение, светобоязнь и блефароспазм (роговичный синдром), являющимися патогномичными симптомами СЛН. Необходимо выяснить как часто и с какой интенсивностью больного беспокоят жалобы, давность и причины возникновения жалоб, какие способы лечения были предприняты ранее. Яркие жалобы при СЛН могут и вовсе отсутствовать, тогда пациентов чаще всего беспокоят сухость, хроническая краснота глаза и косметический дискомфорт.

Подробное выяснение анамнеза: как правило с этим проблем не возникает, однако, следует обратить особое внимание на пациентов, у которых в анамнезе была односторонняя ожоговая травма роговицы, что в 99% случаях сопровождается разной выраженностью СЛН. При этом стоит выяснить каким агентом был поражен глаз (термический, химический: щелочь/спирт/кислота, термохимический, бытовой), и какие действия предпринял пациент сразу после травмы. Были ли какие-либо экстренные или плановые хирургические вмешательства (биологическое покрытие роговицы (чАМ, аллоплант), блефарорафия лечебная кератопластика и т.д.), или курсы консервативного лечения (наименование препаратов, длительность применения, степень эффективности), какая терапия используется по настоящее время.

**пациентам, имеющим в анамнезе кератит в обязательном порядке, должны быть проведены: серологическое исследование крови на медленные инфекции (хламидии, токсоплазмоз, вирус простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловирус) и выполнен посев с конъюнктивы с определением чувствительности к антибиотикам.*

Биомикроскопическое исследование с оценкой характерных признаков, в особенности, периферической конъюнктивализации роговицы. Особое внимание должна обращать на себя зона лимба, необходимо оценить целостность, визуализацию краевой петливой сети и пигментированных лимбальных крипт по всей окружности роговицы. Пациенты, имеющие только помутнения роговицы или неоваскуляризацию, требуют дополнительного обследования. Обязательно выполнение биомикроскопии контрлатерального

глаза и определение степени его вовлеченности. На здоровом или «относительно здоровом глазу» могут присутствовать незначительные повреждения лимба, но строго в пределах 5 часов (M. Busin et al. 2016) иначе, возможно развитие ятрогенного СЛН при выполнении реконструктивной клеточной хирургии. Пациенты, имеющие патологию век, в особенности симблефарон и лагофтальм должны в первую очередь быть направлены в отделение окулопластики для реконструктивно-восстановительной хирургии. Пациенты с воспалительными заболеваниями глазной поверхности в остром периоде (блефароконъюнктивиты и кератиты различной этиологии, демодекс, мейбومیит, синдром сухого глаза средней тяжести) должны быть проконсультированы на предмет терапевтического лечения.

Биомикроскопическое исследование с окрашиванием глазной поверхности флюоресцеином (тест-полоской нмФЛ) на наш взгляд должно быть обязательной манипуляцией, и в большинстве случаев помогает быстро исключить СЛН (в норме роговичный эпителий не окрашивается), либо подтвердить его наличие (по специфическим паттернам окрашивания при СЛН) патологические паттерны окрашивания эпителия описаны ранее (см. Главу 1).

Патологическое окрашивание роговичного эпителия чаще всего связано с ношением жестких или мягких контактных линз, экспозиционной кератопатией роговицы, синдромом сухого глаза, дефектом эпителия при травме или в стадии эпителизации после механического удаления – скарификации эпителия, например при кератопластике или кросслинкинге. Соответственно такие пациенты в первую очередь должны быть направлены в отдел консервативного лечения.

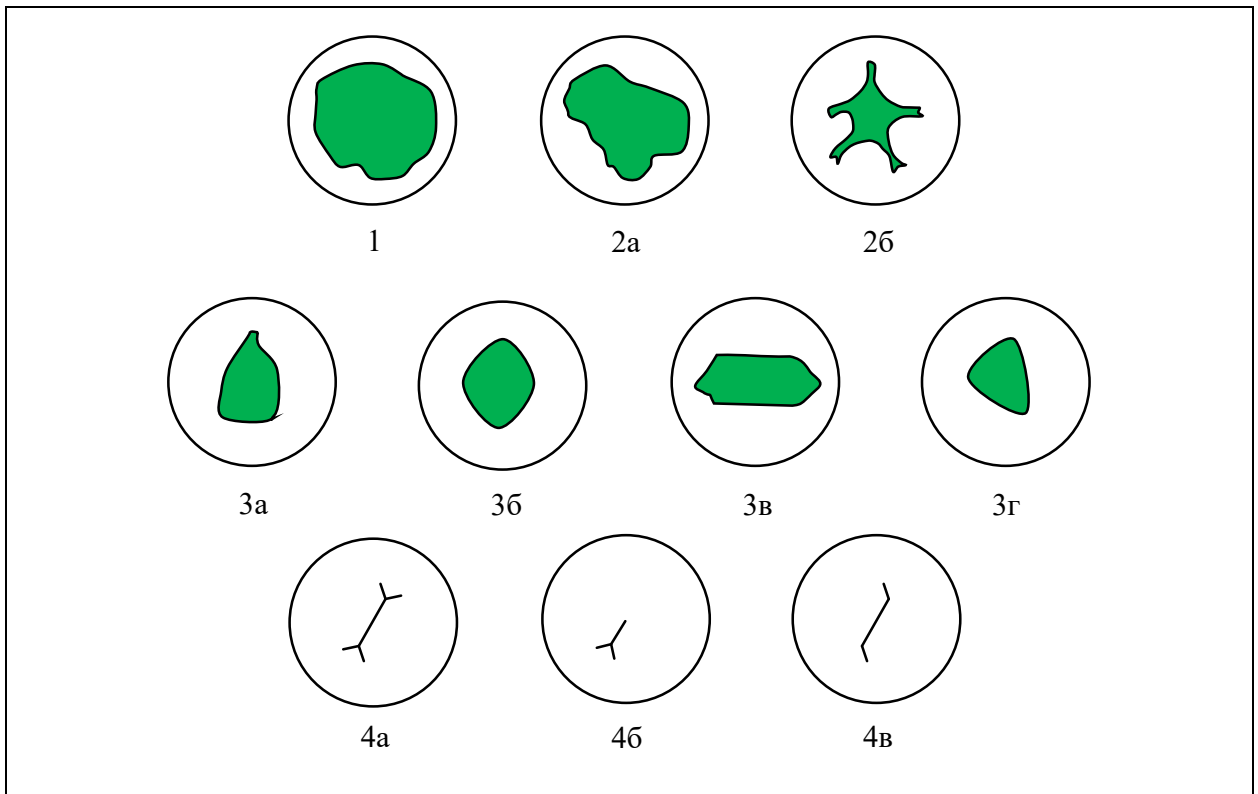


Рисунок 48 – Схема заживления обширной эрозии эпителия роговицы при отсутствии повреждения лимбальных стволовых клеток (по Dua и Forrester, 1987).

Особый интерес представляет паттерн окрашивания при центральном эпителиальном (язвенном) дефекте роговицы. В случае отсутствия повреждения ЛЭСК заживление происходит по стадиям (рисунок 48) [56]:

- 1 – эрозия роговицы,
- 2 (а, б) – формирование основных выпуклых фронтов эпителизации,
- 3 (а, б, в, г) – эпителизация с формированием различных геометрических форм,
- 4 (а, б, в) – образование контактных линий.

Зелёным цветом обозначено прокрашивание роговицы после аппликации флюоресцеина.

В случае повреждения герминативных клеток в зоне лимба развивается патологическое заживление – миграция ткани конъюнктивы на поверхность роговицы, или конъюнктивализация [59]. Она может пересекать лимб на

некотором протяжении (частичный СЛН) или полностью по окружности роговицы (полный СЛН) (рисунок 49). Конъюнктивализация является основным патоморфологическим признаком СЛН [134]. Эрозии роговицы могут сопровождать СЛН, имея различную площадь, расположение (чаще центральное) и тип (рецидивирующая или персистирующая).

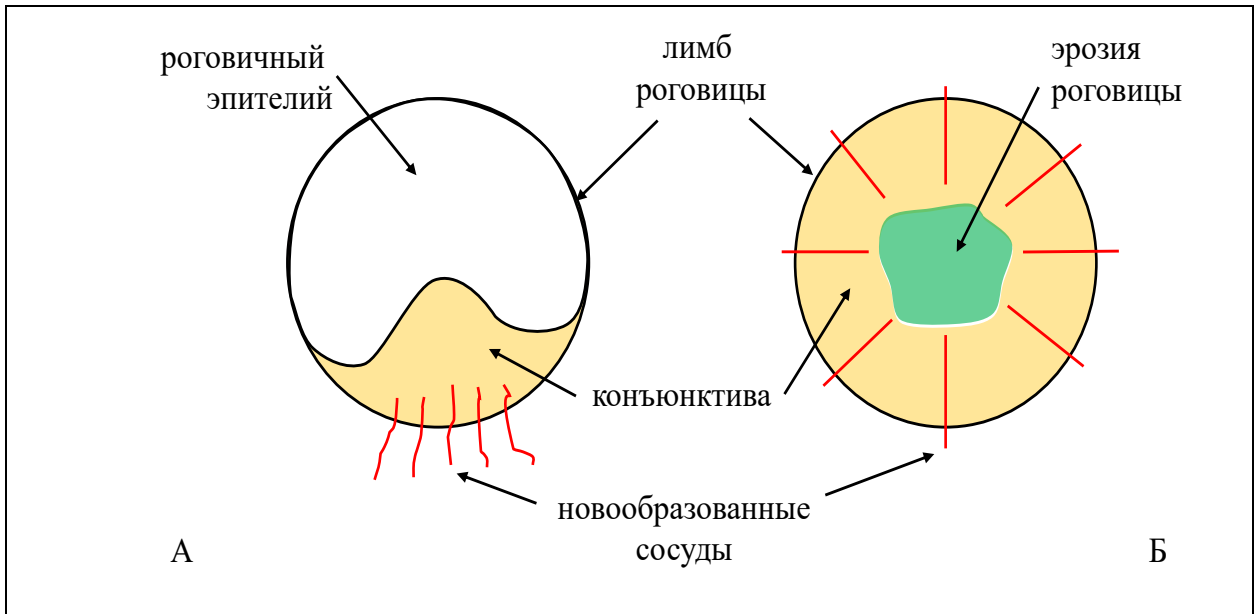


Рисунок 49 – Варианты заживления роговицы **при повреждении** лимбальных стволовых клеток (по Dua и Forrester, 1990 в модификации). А – вариант частичного СЛН: миграция конъюнктивальной ткани и кровеносных сосудов на переднюю поверхность роговицы. Б – вариант полного СЛН с центральной эрозией роговицы: миграция конъюнктивальной ткани и кровеносных сосудов на переднюю поверхность роговицы. Зелёным цветом обозначено окрашивание роговицы после аппликации флюоресцеина.

При подозрении у пациента СЛН должна быть выполнена **дополнительная диагностика**, а именно:

1) ОКТ переднего отрезка глазного яблока. Обязательным является исследование толщины роговицы (ее равномерности, мест наибольшего истончения) и фиброваскулярной ткани (для примерной ориентировки возможной глубины иссечения) во многом определяют тактику хирургического лечения. Так, в случае значительного истончения роговицы (менее 250 мкм по данным пахиметрии) операцией выбора будет ALK+

G-SLET. Особого внимания требует состояние передней камеры (наличие или отсутствие иридо-корнеальных сращений, ретро-корнеальных мембран, степени открытости угла передней камеры и других особенностей), указывающие на возможные риски развития глаукомы и воспалительные процессы;

2) ОКТ в режиме Ангио является не обязательным, но полезным дополнительным методом исследования и служит для динамической оценки степени неоваскуляризации роговицы в случае значительных её помутнений. Глубина расположения сосудов и их количество позволяют прогностически оценить дальнейший исход кератопластики после восстановления эпителиального слоя. Так известно, что неоваскуляризация ложа реципиента в 2-х и более квадрантах с глубоко расположенными сосудами, заходящими, по крайней мере, на 2 мм в строму, является фактором риска, связанным с высокой вероятностью развития реакции тканевой несовместимости так как новообразованные сосуды способствуют доставке к трансплантированной ткани иммунокомпетентных клеток. [138]. Наличие сосудов в четырех квадрантах удваивает риск отторжения, увеличивая тяжесть иммунной реакции [31].

3) ЛСКМ является не обязательным дополнительным методом исследования. Метод позволяет визуализировать, во-первых, структуры палисад Вогта и фокальных стромальных проекций на здоровом глазу (в случае незначительного повреждения глаза-донора) и глазу-реципиенте (палисады могут быть разрушены или отсутствовать вовсе, покрыты новообразованными сосудами); во-вторых, в центральной части роговицы можно в сравнительном аспекте здорового и пораженного глаза оценить степень зрелости и морфологию эпителиоцитов, наличие воспалительных клеток, рефлективность цитоплазмы, ядер и форму клеток.

4) ИЦ с ИЦХ исследованием на специфические кератины является не обязательным, но важным дополнительным методом исследования, и при этом самым точным при установке диагноза СЛН. Подробная методика забора

клеток и протоколы окрашивания описаны в главе 4, раздел 4.1. таблица 11. На рисунке 30 указаны маркеры K7 и 19 являющиеся специфическими для конъюнктивы, а K12 – является маркером роговичного эпителия. Возможно обнаружение смешанной экспрессии K12 и K7/19 при неполном СЛН. Соответственно, при обнаружении только K12 диагноз СЛН может быть опровергнут.

Если по данным проведенных диагностических методов исследования диагноз СЛН подтвердился, то выбор оперативного лечения будет зависеть от:

1) Толщины роговицы и фиброваскулярного паннуса, если изначальная толщина роговицы и паннуса менее 250-300 мкм (по данным пахиметрии), то предпочтение следует отдать в пользу фемтолазерной ALK G-SLET;

2) Наличия у хирурга ФСЛ (в случае его отсутствия, хирург может использовать мануальную технику G-SLET или ALK G-SLET);

3) Степени вовлеченности роговицы здорового глаза пациента;

4) Степени помутнения и васкуляризации роговицы (которые влияют на работу ФСЛ), при планировании оптического результата и наличии исключительно поверхностных помутнений роговицы, что обеспечивает техническую возможность проведения ALK + G-SLET.

Подробно преимущества и описание каждой технологии лечения представлены в главе 5, раздел 5.1.

Рисунок 50 – Алгоритм ведения пациентов с СЛН на поликлиническом этапе.

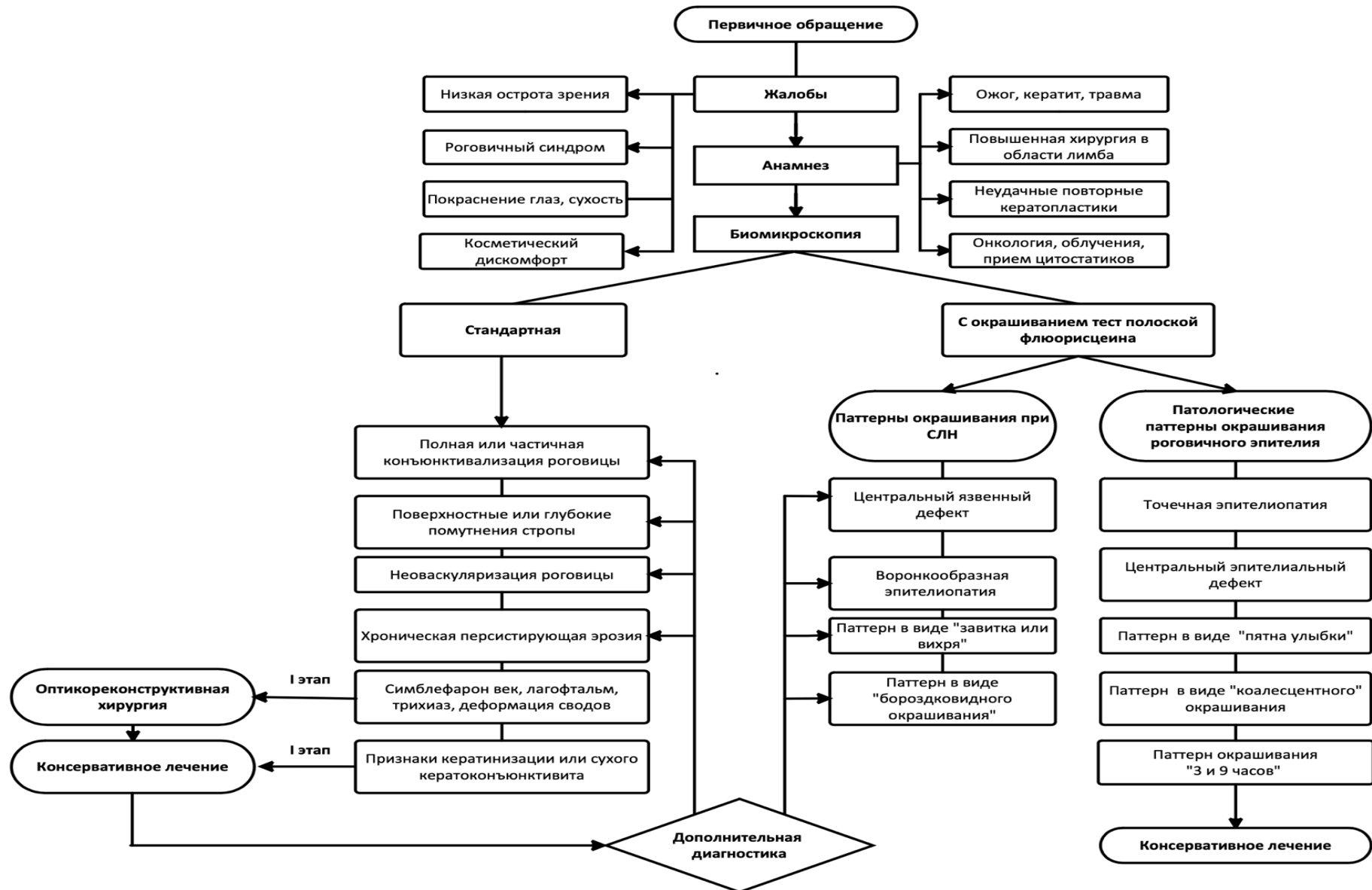
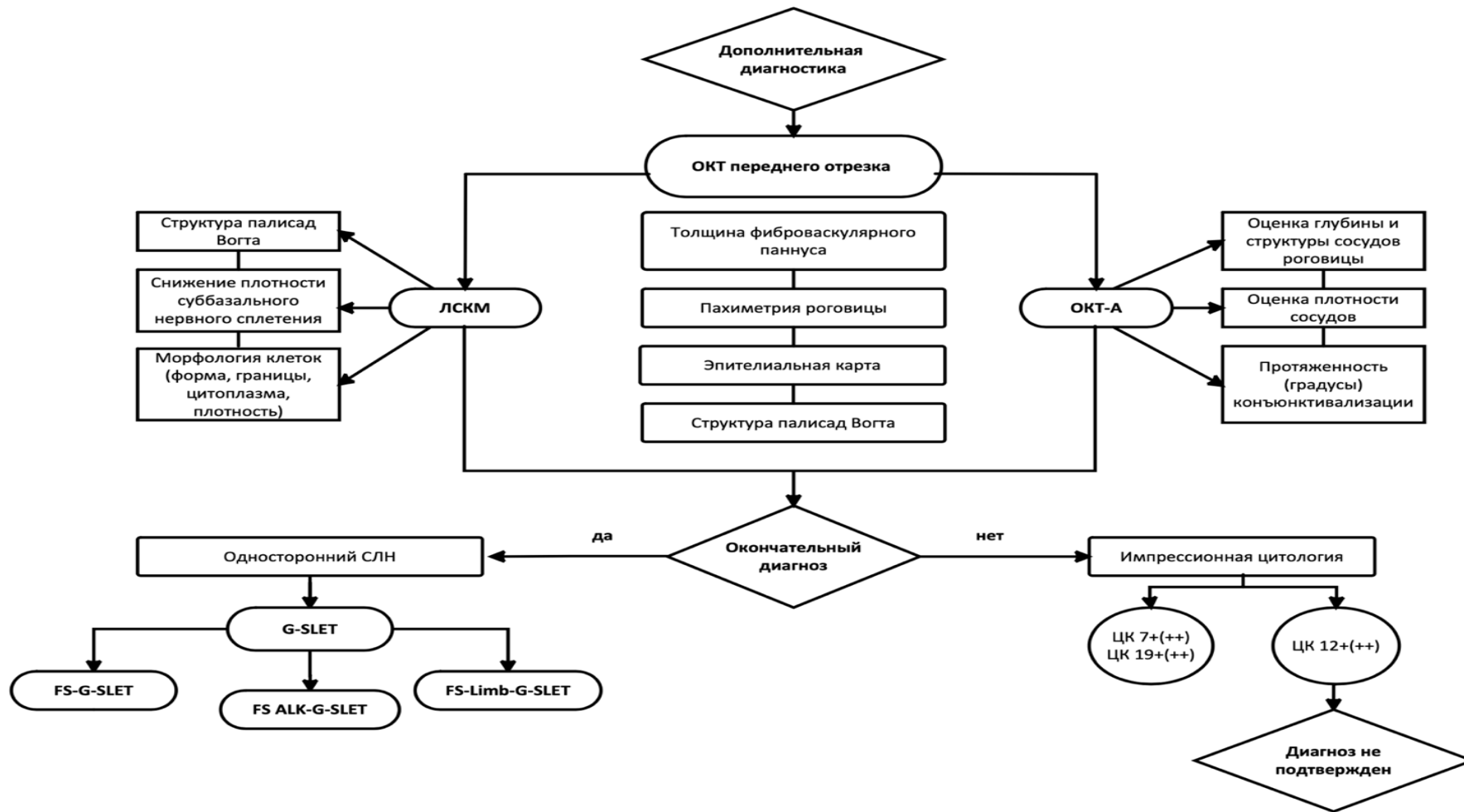


Рисунок 51 – Алгоритм дополнительной диагностики СЛН



. ОКТ-Оптическая когерентная томография; ЛСКМ-Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; ОКТ-А-Оптическая когерентная томография в режиме Angio; G-SLET-Glueless simple limbal epithelial transplantation (бесклеевая простая лимбальная эпителиальная трансплантация); FS-Femtosecond laser assisted (фемтолазер-ассистированная); ALK -Anterior lamellar keratoplasty (передняя послойная кератопластика).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СЛН – это полиэтиологическое заболевание глазной поверхности, характеризующееся отсутствием физиологической эпителизации роговицы в следствие разрушения пула унипотентных прогениторов (ЛЭСК - предшественников). Данная популяция клеток располагается по периферии роговицы – в зоне лимба, который служит анатомическим барьером для нарастания конъюнктивального эпителия. Клинический СЛН характеризуется замещением роговичного эпителия на конъюнктивальный, и/или другими признаками эпителиальной дисфункции такими как: персистирующая или рецидивирующая эрозия роговицы с и без неоваскуляризации, хроническое воспаление глазной поверхности и образование рубцовой ткани роговицы (фиброваскулярного паннуса) [71]. Согласно международному консенсусу, СЛН подразделяют на частичный и полный. При частичном – конъюнктивализация роговицы неполная, и имеются остаточные лимбальные стволовые и роговичные эпителиальные клетки. Полный СЛН характеризуется конъюнктивализацией всей поверхности роговицы (фиброваскулярный паннус) вследствие полной утраты герминативных клеток эпителия ЛЭСК [71]. Помимо повреждения роговицы, СЛН может сопровождается развитием экстраокулярной патологии. Например, при ожоговой травме могут формироваться различные деформации краев век (рубцовые изменения), неполное закрытие глазной щели (лагофтальм) с формированием трихиаза, симблефарона и др., что дополнительно требует зачастую неоднократного проведения оптико-реконструктивного этапа для подготовки глазной поверхности к реконструкции эпителия роговицы. Данное обстоятельство обуславливает необходимость формирования комплексного подхода к зрительной реабилитации и выполнению работы специалистов нескольких офтальмологических профилей совместно.

Основными жалобами при возникновении СЛН являются: низкая острота зрения, хронический болевой синдром, светобоязнь, слезотечение,

блефароспазм, косметический дискомфорт, что значительно ухудшает социальную адаптацию пациентов. Стоит также учитывать, что поражению роговицы подвержены не только взрослые, нередко случаи развития СЛН и у детей. В последнем случае происходит неполноценное развитие зрительного анализатора, с формированием амблиопии и косоглазия. Таким образом, СЛН является серьезным заболеванием, требующим комплексного подхода к его лечению.

Диагностика СЛН уже много лет является актуальным направлением в офтальмологии, так как обнаружение данной патологии стратегически определяет подход к хирургическому лечению. Первоначальная, но не менее сложная задача, с которой сталкивается врач — это постановка правильного диагноза. В этом случае разобраться есть ли у данного пациента СЛН, порой является весьма затруднительным из-за не всегда очевидной и/или стертой биомикроскопической картины. Так, в поисках наиболее точного неинвазивного метода подтверждения СЛН зарубежными авторами было опубликовано множество работ посвящённых методике ИЦ, которая впервые была описана Egbert и соавт. (1977) [64]. Тогда, эта методика была использована как способ получения мазков-отпечатков с конъюнктивы с последующими окрашиванием стандартными реагентами (гематоксилин-эозин, альциановый синий) [64, 84]. С течением времени ИЦ стали выполнять все чаще, в том числе пациентам с СЛН, при этом фокус внимания был сосредоточен на обнаружении БК конъюнктивы на поверхности роговицы, что гистологически подтверждало диагноз СЛН. Однако, в 2001 году этот диагностический признак был опровергнут как основной. Dua Н. и соавт. на 137 пациентах с ожогами роговицы [55] определили БК как не специфический признак в силу различной степени тяжести протекания СЛН, когда БК могут вовсе отсутствовать. Так, поиски специфических клеточных маркеров конъюнктивализации роговицы продолжились, а ряд зарубежных авторов стали использовать методики сложного окрашивания с применением первичных и вторичных антител - ИЦХ отпечатков роговицы на

специфические внутриклеточные белки эпителиальных тканей – кератины (К). Было представлено множество работ по выявлению экспрессии роговичных и конъюнктивальных белков таких как: К 3, 7, 12, 13, 19 [41, 67, 82, 86, 97, 98, 148] и специфических муцинов БК конъюнктивы MUC5AC, MUC1 [42, 67, 82]. Однако, исследователи выделяют особенно высокую специфичность для маркеров конъюнктивального эпителия (К7) [148] и роговичного эпителия (К12) [41, 67].

В представленной научной работе впервые на территории РФ была применена и описана технология ИЦХ анализа у пациентов с СЛН. Все исследования выполнялись на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, полученные образцы отпечатков роговицы были окрашены по разработанному протоколу (см. главу 4, раздел 4.1). В данном исследовании проводили окрашивание для выявления всех выше предложенных К и муцинов БК. В результате исследований было выявлено, что обнаружение специфических маркеров является наиболее значимым в диагностике СЛН. В когорте из 11 пациентов с подозрением на наличие СЛН (по биомикроскопии и окрашиванию глазной поверхности) этот синдром подтвердили у 9-ти пациентов (таблица №12) путем выявления двух маркеров: для конъюнктивы - К7 и для роговицы - К12, доказавших свою специфичность. Экспрессия указанных К с большой вероятностью подтверждает (К7) или опровергает (К12) диагноз СЛН. Таким образом, представленный метод исследования является наиболее значимым в случае затруднений диагностики СЛН. Дальнейшая тактика лечения определялась следующим образом: 9 пациентам с подтвержденным СЛН выполняли G-SLET, оставшимся двум – трансплантацию донорской роговицы.

Несмотря на все вышесказанное, необходимо учитывать, что качество диска для ИЦ, условия получения отпечатка и состояние глазной поверхности

в значительной степени влияют на результаты исследования. В то же время несомненным преимуществом ИЦ является повторяемость метода.

Экспериментальное исследование иммуно-фенотипа клеток из лимбальных трансплантатов было выполнено неоднократно, в особенности в работах, посвященных культивированию клеток с последующей трансплантацией на роговицу пациента. Однако СК, используемые для пересадки, представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, поскольку методы культивирования не всегда селективны и специфичны. Следовательно, эти культуры содержат множество типов клеток, начиная от эпителиальных, конъюнктивных или стромальных СК и клеток-предшественников, заканчивая зрелыми клетками конъюнктивы и роговицы, кератоцитами, и, вероятно, БК и клетками сосудов и крови. Важно отметить, что отсутствие обогащения культуры стволовыми/прогениторными клетками может быть причиной дисфункции приживления трансплантата, поскольку только истинные СК могут способствовать долгосрочному гомеостазу эпителия роговицы [120]. Следовательно, способность проспективно выделять истинные ЛЭСК для трансплантации имеет решающее значение для обеспечения успешного долгосрочного приживления. Сам процесс культивирования клеток из биоптатов варьируется в лабораториях по всему миру. Предложены варианты выращивания клеток на биологической подложке чАМ [136], или на передней капсуле хрусталика [51], контактной линзе [85] или фибриновом геле [108] с последующей пересадкой на поверхность роговицы. Материал может быть получен как в ауто- так и в алло-вариантах.

В сравнении с другими подобными исследованиями, наибольший интерес получило изучение пула Л-ММСК, культивированных из цельных лимбальных эксплантов донорской роговицы на различных средах (бессывороточной и стандартной) [16, 17, 20, 21] для сохранения наибольшей жизнеспособности и повышения пролиферативной активности [4]. Данная клеточная популяция интересна благодаря своим иммунокорректирующим и

секреторным свойствам для поддержания пула эпителиальных стволовых/прогениторных клеток, и обеспечения процессов физиологической и репаративной регенерации роговицы [118].

Известно, что пересадка культивированных СК не имеет разрешения на территории РФ. Так как хирургическая технология G-SLET включает пересадку фрагментов лимбального аутотрансплантата на периферию пораженной роговицы, без предварительного культивирования, целью нашего экспериментального исследования стало изучение способности клеток к пролиферации, с выявлением их специфического иммуно-фенотипа, уровня стволовости в зависимости от сроков культивирования и вида культуральной среды: (предназначенной для преимущественного роста эпителиальных клеток Epilife/ и для ММСК - DMEM/F12). Результаты проведенного исследования позволили выявить сроки необходимого культивирования для миграции клеток на поверхность чашки Петри, а именно первичный рост на 7-ые сутки, фаза активного деления на 14-ые сутки. Несмотря на специфичность среды культивирования для определенных клеток, был выявлен равнозначный рост ЛСК: фенотипически как незрелых эпителиальных, так и ММСК в обоих видах. По данным оценки клеток первичного пассажа методами ИЦХ и проточной цитофлюорометрии был выявлен высокий потенциал пролиферации клеток (p63, Ki67), высокий уровень стволовости (CD 73, 90, 105) и экспрессии маркера эпителиальных клеток (CD 29). Таким образом, культура клеток, полученная из эксплантов лимба роговицы, характеризуется как популяция содержащая в своём абсолютном большинстве ЛЭСК, необходимые для полноценной эпителизации роговицы при СЛН.

В научном аспекте изучение профиля цитокинов в СЖ высоко коррелирует со степенью поврежденности роговицы и активации различных про- и противовоспалительных факторов в слезе, влияющих на особенности течения заболевания и приживления СК у пациентов с СЛН. Однако, исследований на эту тему на настоящий момент недостаточно. По имеющимся

данным литературы, характер приживления кератотрансплантата в 70-80% находится в прямой зависимости от предоперационной активации иммунитета и послеоперационной динамики его показателей: соотношения пулов отдельных популяций иммунокомпетентных клеток, количества циркулирующих иммунных комплексов, уровней антител и цитокинов, в первую очередь ИЛ-1 β и TNF- α в сыворотке крови и в слезе, а также от наличия сенсibilизации иммунокомпетентных клеток к антигенам роговицы [6, 7, 133].

В одном из исследований была показана специфичность экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-1 β , который в значительной степени повышен на глазу с СЛН по сравнению с парным здоровым глазом [153]. Однако, в данной группе пациентов уровень цитокинов изучался на более отдаленных сроках, где было показано, что после 12 месяцев после операции имеется всплеск уровней ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8, что совпадает с прекращением приема местных стероидов, и свидетельствует о продолжающемся субклиническом воспалении. В результате авторы рекомендуют использовать терапию местными глюкокортикостероидами на протяжении более длительных сроков. Еще одна экспериментальная работа была посвящена изучению ИЛ на модели повреждения лимба роговицы мыши щелочью [150], где в контрольной группе была выявлена высокая экспрессия провоспалительных цитокинов в СЖ (ИЛ-1 β , TNF- α и ИЛ-6).

В нашем исследовании по изучению цитокинового профиля в СЖ у пациентов в зависимости от типа СЛН (полный и не полный) впервые было показано, 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, но не на высоком уровне активности. Фактор роста фибробластов TGF- β на всех этапах исследования в послеоперационном периоде по своей активности соответствовал клиническим симптомам истинного приживления лимбальных аутооттрансплантатов при отсутствии активности процесса ремоделирования.

На сегодняшний день арсенал предложенных хирургических методик является либо высоко-травматичными, либо малоэффективным (CLAU/CLAL, KLAU/KLAL), либо не имеющим разрешения на территории РФ по причине необходимости культивирования клеток (CLET) или использования фибринового клея (SLET) (основные виды хирургического лечения описаны в главе 1, таблице 2). Именно поэтому реконструкция глазной поверхности является весьма актуальным направлением в современной офтальмологии, в том числе применительно к Российской Федерации. На данный момент аутотрансплантация ЛЭСК является единственным эффективным методом лечения и потенциально может обеспечить полное устранение симптомов заболевания, а также зрительную реабилитацию. Так до недавнего времени такие пациенты были обречены на повторные и зачастую неудачные кератопластики, либо, как крайний вариант - кератопротезирование. В нашей практике ежедневно встречаются пациенты, которым уже ни раз выполняли СКП, проводили многолетние курсы консервативного лечения, применяли терапевтические контактные линзы, биологические покрытия роговицы амнионом или аллоплантом, введение препаратов подавляющих ангиогенез и т.д. Однако, в большинстве случаев, это было лишь симптоматическим лечением, которое оказывало временный эффект.

В поисках наиболее доступной и эффективной технологии трансплантации ЛЭСК, в 2012 году была представлена новая технология - SLET (V. Sangwan) [143]. В литературе описаны отдаленные клинико-функциональные результаты в 125 клинических случаях успешного лечения (стабильная ре-эпителизация роговицы) в 80% случаев у взрослых и 71% у детей на сроках 12 месяцев [144]. Однако, как уже упоминалась ранее, авторы использовали фибриновый клей, не сертифицированный на территории РФ. Это обстоятельство обусловило поиск альтернативных вариантов клеточной хирургии лимба. В 2018 году профессором Малюгиным Б.Э. и соавторами была предложена оригинальная техника имплантации фрагментов лимба со здорового глаза в роговичные туннели, расположенные на периферии

роговицы без использования фибринового клея – G-SLET [113]. Первые результаты лечения 24 пациентов по данной методике вошли в тему данной диссертационной работы и подробно описаны в главе 5 раздел 5.2. В процессе отработки классической G-SLET (глава 5 раздел 5.1.) происходило активное совершенствование ключевых этапов техники операции, включая:

1. применение алмазного микробора для выравнивания роговицы;
2. подшивание конъюнктивы к склере для точной фиксации и устранения смещения тканей;
3. методика имплантации и расположения аутотрансплантатов склеральным концом внутри туннеля, а роговичным - наружу (способствует оптимальному вектору выхода клеток из туннеля);
4. отказ от использования чАМ и блефароррафии ввиду большой травматизации и случаев повторной неоваскуляризации (при применении чАМ);
5. применение МКЛ в раннем послеоперационном периоде для защиты роговицы и ускорения эпителизации;
6. использование низкоэнергетического ФСЛ для формирования роговичных тоннелей, для снижения риска перфорации роговицы по сравнению с мануальной техникой. Встроенное в модуль лазера интраоперационное ОКТ позволило центрировать и выбирать оптимальную глубину реза в зависимости от толщины роговицы. В целом применение лазерной системы стандартизирует операцию, упрощая ее проведение, делая более доступной;
7. использование интраоперационной ОКТ встроенной в микроскоп, в особенности при мануальной технике и отсутствии ФСЛ, позволяет контролировать равномерность поверхности роговицы после удаления паннуса, остаточную толщину роговицы, глубину туннелей и положение трансплантатов.

Помимо усовершенствований технологии G-SLET в 2020 году группой авторов под руководством профессора Малюгина Б.Э. впервые была

предложена новая технология послойной трансплантации донорской роговицы одновременно с пересадкой ЛЭСК (подробное описание техники см. главу 5, раздел 5.1.). Идея передней послойной пересадки роговицы связана с частым сочетанием случаев истончения роговицы и СЛН, ввиду которого проведение стандартной G-SLET становится технически затруднительным или даже невозможным [54].

В зарубежной практике ряд исследователей проводили СКП первым этапом, а реконструкции эпителия роговицы вторым, однако было отмечено, что такое лечение не способствует восстановлению стойкого эпителиального покрова роговицы [30, 144]. Также было установлено, что СКП, совмещённая с пересадкой культивированных ЛЭСК, как правило, не приводит к анатомическому успеху – эпителизации роговицы [140]. Результаты лечения пациентов по новой технологии ALK+G-SLET показали высокую эффективность в отношении пациентов с истонченными роговицами. В случае трансплантации фрагмента стромы донорского трансплантата риск развития реакции отторжения минимален, имплантация аутооттрансплантатов не требует формирования дополнительных туннелей, клетки растут по неповрежденной БМ донора. Эпителизация и высокий клиничко-функциональный результат достигаются в ранние сроки и наблюдаются в течение года, как и при технологии без использования донорской ткани (только G-SLET).

Очевидно, что новые технологии не лишены недостатков: пока группа набранных пациентов относительно мала, известны лишь годовые клиничко-функциональные результаты, операция в целом трудоемка и занимает значительное время, а также требует дорогостоящего оборудования (ФСЛ) и высокие хирургические навыки.

Обобщая выполненные экспериментальные и клинические исследования, в данной работе мы представляем оригинальный новый алгоритм первичного и дополнительного диагностического обследования пациентов с характерными для СЛН паттернами/признаками, тактикой ведения и выбора хирургического лечения, а также подробные описания

методологии исследований и технологии операций, которые помогут специалисту и начинающему исследователю в постановке правильного диагноза и обнаружения возможно новых особенностей клиники СЛН.

Считаем крайне важным учитывать нюансы сопутствующей патологии век, сводов; наличие острых/хронических воспалительных заболеваний глазной поверхности, которые необходимо устранить до пересадки стволовых клеток лимба.

Немало важным вопросом, не освещенным в работе ранее, является дифференциальная диагностика одностороннего СЛН с другими, на первый взгляд схожими патологиями. В заключении представлена таблица №22, в которой кратко изложена этиология, патогенез и клиническая картина заболеваний схожего характера.

Таким образом, в данной работе продемонстрирована полная клиническая картина заболевания, описаны все существующие виды диагностики, предложены новые варианты техники пересадки ЛЭСК с модификациями. Полученные высокие клинико-функциональные результаты позволяют рекомендовать алгоритм диагностики и хирургического лечения у пациентов с односторонним СЛН для внедрения в широкую клиническую практику.

Таблица №22 – Дифференциальная диагностика одностороннего СЛН.

Признак	Этиология и патогенез	Жалобы	Клиническая картина			
			Эпителизация	Конъюнктивализация	Неоваскуляризация	Помутнение
1) Птеригиум [112];	<p>Этиология точная неизвестна. Многофакторная теория связана с УФ облучением, инсоляцией, хроническим воспалением и инфекцией вируса папилломы человека (ВПЧ).</p> <p>Патогенез: метаплазия плоского эпителия на фоне гиперплазии БК конъюнктивы вызывают активацию фибробластов стромы и разрыв БМ в результате чего происходит рост конъюнктивы на поверхность роговицы [123]</p> <p><i>*может быть двухсторонним</i></p>	<p>Неспецифические</p> <p>-возможно снижение остроты зрения</p> <p>-косметический дискомфорт</p> <p>-синдром красного глаза</p>	Частичная (за исключением места нарастания головки птеригиума)	Треугольной формы с носовой стороны	Не характерна	Не характерно

2) Трахома	<p>Этиология: инфекция вызванная Chlamydia trachomatis</p> <p>Патогенез: инвазия хламидии в клетки конъюнктивы и эпителия роговицы с последующим размножением <i>*чаще двухсторонний</i></p>	<p>Специфические:</p> <ul style="list-style-type: none"> -острое начало -отек слизистой век и гиперимия -жжение, чувство инородного тела -светобоязнь, слезотечение 	Полная	Обильная инфильтрация конъюнктивы в виде фолликулов (трахоматозные зерна) с последующим рубцеванием конъюнктивы	Новообразованные сосуды врастают в области лимба с формированием трахоматозного паннуса	Не характерны
3)Липидная кератопатия роговицы [109];	<p>Этиология: идиопатическая или вторичная (предшествует воспаление или травма глазной поверхности).</p> <p>Патогенез: неоваскуляризация роговицы, при которой сосудистая ткань имеет патологическую проницаемость по причине отсутствия плотных контактов, перипитов и истончения базальной мембраны, через которую</p>	<p>Неспецифические</p> <ul style="list-style-type: none"> -Снижение остроты зрения -Косметический дискомфорт 	Полная	Не характерна	Врастание магистрального сосуда в строму с периферической частью роговицы в помутнение с обильным разветвлением сосуда	Дискообразное по форме помутнение по периферии роговицы, окруженное сосудами и аморфными зернистыми/кристаллическими отложениями

	происходит просачивание липидов;					
4) Дистрофии роговицы, первично поражающие эпителий или БМ	Этиология: врожденная мутация генов <i>*чаще двусторонние</i>	Неспецифические: -Снижение остроты зрения -болезненные ощущения на свет	Полная могут просматриваться микрокисты или пузырьки эпителия с мелкими эрозиями	Не характерна	Не характерно	Точечные субэпителиальные помутнения или картообразные. Полиморфизм признаков
5) Кератит без СЛН	Этиология: чаще вирусная или бактериальная (кератоконъюнктивит). Патогенез: обусловлен внутриклеточной инвазией вирусного или бактериального агента с последующей репликацией или размножением на поверхности роговицы и конъюнктивы	Специфические: -обильное отделяемое (слизистое или гнойное) -гиперимия и отек конъюнктивы -слезотечение, светобоязнь, блефароспазм,	Полная (в стадии ремиссии) или наличие эрозии роговицы (в остром периоде)	Не характерна	Возможна локальная поверхностная васкуляризация	Локальные или диффузные на месте инфекционного очага

	<i>*процесс двухсторонний или односторонний, хронический или острый</i>	-чувство инородного тела - незначительное снижение остроты зрения				
б)Плоскоклеточная неоплазия глазной поверхности (Ocular Surface Squamous Neoplasia OSSN) [32]	Этиология: УФ излучение, иммуносупрессия, пигментная ксеродерма, ВПЧ, повышенная экспрессия p53, мутации в ЛСК Патогенез: злокачественная метаплазия и пролиферация конъюнктивальных клеток на поверхности роговицы <i>*редко двухсторонняя</i>	Неспецифические: -снижение остроты зрения -гиперимия -косметический дискомфорт	Вне очага полная	Периферическое разрастание метапластического эпителия, может иметь приподнятый (гроздьевидный) или плоский вид, бледно-розового и белесоватого цвета с обильной васкуляризацией . Распологается паралимбально,	Не характерно	Не характерно

				может заходить на роговицу.		
7) Язва Мурена [10]	<p>Этиология: аутоиммунное поражение роговицы. Первичная (идиопатическая), вторичная (спровоцирована рядом факторов: катарактальная хирургия, кератопластика, травмы и ожоги роговицы, инфекции).</p> <p>Патогенез: до конца неясен, аутоиммунный генезе заболевания обусловлен обнаружением большого количества плазматических клеток, лимфоцитов и гистиоцитов, основными функциями которых является выработка антител.</p>	<p>Специфические:</p> <ul style="list-style-type: none"> -выраженный болевой синдром -слезотечение -светобоязнь -блефароспазм -низкая острота зрения 	Периферический язвенный дефект с подрытыми краями может распространяться до центральной части роговицы, значительное истончение по периферии	Конъюнктивализация роговицы не характерна	Обильная поверхностная и глубокая	Возможны периферические диффузные помутнения в виде серо-белого инфильтрата

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 ("булыжная 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 с односторонним СЛН по данным компьютерного анализа изображений к 6 месяцам после операции составил 58,3%, а через год - 75%, медиана МКОЗ 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 нмФЛ 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 СОКРАЩЕНИЙ

- СЛН – синдром лимбальной недостаточности
ИГХ – иммуногистохимия
ИЦХ - иммуноцитохимия
ИЦ - импрессионная цитология
ФСЛ – фемтосекундный лазер
нмФС – низкомолекулярный флюорисцеин
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
ЛЭСК – лимбальные эпителиальные стволовые клетки
ЛСК – лимбальные стволовые клетки
СК - стволовые клетки
Л-ММСК – лимбальные мезенхимальные стволовые клетки
СКП – сквозная кератопластика
ЛСКМ - лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
БК – бокаловидный клетки
К – кератины
ОКТ – оптическая когерентная томография
СЖ – слезная жидкость

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анатомия глазного яблока и придаточного аппарата: учебник для студентов-иностранцев / составители : П.А. Бездетко, С.Ф. Зубарев, Н.В. Панченко [и др.] ; Харьковский национальный медицинский университет. – Харьков : Издательство ХНМУ, 2012. – 44 с. – URL:<https://repo.knmu.edu.ua/handle/123456789/4962?mode=full> (дата обращения: 07.04.2023). – Текст : электронный.
2. Вэндер, Дж.Ф. Секреты офтальмологии : учебник / Дж. Ф. Вэндер, Дж. А. Голт ; перевод с английского ; под общей редакцией Ю.С. Астахова. – 2-е издание. – Москва : МЕДпресс информ, 2008. – 464 с. – ISBN 5-98322-385-2. – Текст : непосредственный.
3. Диагностика синдрома лимбальной недостаточности. Обзор литературы / Б.Э. Малюгин, С.А. Борзенко, С.Ю. Калининкова, М.Ю. Герасимов. – Текст : непосредственный // Офтальмохирургия. – 2022. – №3. – С. 82–97.
4. Диагностические возможности оптической когерентной томографии в визуализации лимбальных палисад Фогта. – Текст : непосредственный / А.А. Воскресенская, Н.А. Поздеева, А.А. Шипунов, Б.В. Гаглоев // Современные технологии в офтальмологии. – 2017. – № 3 (16). – С.103-106.
5. Длительная нормотермическая консервация лимбальных трансплантатов как способ повышения количества и активности ММСК-подобных лимбальных клеток / С.А. Борзенко, Н.А. Онищенко, Х.Д. Тонаева [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Трансплантологии и искусственных органов. – 2012. – Т.14, № 2. – С. 77-85.
6. Иммунологическая диагностика и прогнозирование приживления кератотрансплантатов / В.В. Волков, В.Х. Хавинсон, М.Н. Пасхина, Ю.И. Пирогов. – Текст : непосредственный // Вестник офтальмологии. – 1986. – Т. 102, № 5. – С. 27-31.

7. Иммунология глазной патологии : учебное пособие / Н.А. Пучковская, Н.С. Шульгина, Н.Г. Минев, Р.К. Игнатов. – Москва : Медицина, 1983. – 208 с. – Текст : непосредственный.
8. Импрессионная цитология: диагностические возможности в офтальмологии / Т.К. Волкович, И.В. Самсонова, Т.А., Имшенецкая, И.В. Залуцкий. – Текст : непосредственный // Российская детская офтальмология. – 2016. – № 1. – С. 46-52.
9. Каспаров, А.А. Офтальмогерпес : учебное пособие / А.А. Каспаров; Москва : Медицина, 1994. – 222 с. – ISBN 5-225-09161-7. – Текст : непосредственный.
10. Каспарова, Е.А. Язва Мурена / Е.А. Каспарова, Е.И. Краснолуцкая, Е.М. Круглова. – Текст : непосредственный // Вестник офтальмологии. – 2020. – Т.136, № 5. – С.241-247.
11. Комах, Ю.А. Клинико-цитохимические аспекты прогнозирования и профилактики помутнения трансплантата после рекератопластики : специальность 14.00.08 «Глазные болезни» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Комах Юрий Алексеевич ; [Место защиты : федеральное государственное автономное учреждение «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Минздрава России]. – Москва, 1995. – 23 с. – Текст : непосредственный.
12. Конфокальная микроскопия роговицы в кераторефракционной хирургии. Обзор литературы / Н.П. Паштаев, И.Л. Куликова, О.В. Шленская, Л.Н. Волкова. – Текст : непосредственный // Вестник Тамбовского университета. Серия «Естественные и технические науки». – 2015. – Т.20, № 3. – С. 662-666.
13. Роль импрессионной цитологии в оценке фенотипа эпителия роговицы при решении вопроса о показаниях к операции оптической кератопластики / И.А. Злобин, В.Ф. Черныш, С.В. Чурашов. – Текст :

непосредственный // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – № 1 (53). – С. 89-93.

14. Слепова, О.С. Практическое значение исследования цитокинов при заболеваниях глаз / О.С. Слепова. – Текст : непосредственный // VII съезд офтальмологов России : тезисы докладов научной конференции (Москва, 16-19 мая 2000 г.). Ч. 2. – Москва, 2000. – С.159-160.

15. Состояние иммунитета при заболеваниях, травмах и трансплантации роговицы / Ю.И. Пирогов, М.М. Дронов, К.Б. Першин [и др.]. – Текст : непосредственный // Офтальмохирургия и терапия. – 2002. – Т. 2, № 1. – С. 29-47.

16. Тонаева, Х.Д. Лимбальная сотрансплантация в профилактике отторжения донорских роговиц при кератопластике высокого риска : специальность 14.01.07 «Глазные болезни», 14.01.24 «Трансплантология и искусственные органы» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Тонаева Хадиджат Джанхуватовна ; [Место защиты : федеральное государственное автономное учреждение «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова Минздрава России]. – Москва, 2014. – 138 с. – Текст : непосредственный.

17. Тонаева, Х.Д. Лимбальная трансплантация как способ индукции локальной иммунной толерантности при кератопластике высокого риска / Х.Д. Тонаева, Н.А. Онищенко, С.А. Борзенко. – DOI: 10.15825/1995-1191-2011-2-95-102. – Текст : электронный // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – № 8. – С. 95-102. – URL: <https://journal.transpl.ru/vtio/article/view/381> (дата обращения: 07.04.2023).

18. Труфанов, С.В. Селективная кератопластика в лечении буллезной кератопатии : специальность 14.01.07 «Глазные болезни» : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Труфанов Сергей Владимирович ; [Место защиты : Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт глазных болезней»

Российской академии медицинских наук]. – Москва, 2015. – 293 с. – Текст : непосредственный.

19. Халимов, А.Р. Строение и функции роговицы. Обзор литературы / А.Р. Халимов, В.К. Суркова, Г.М. Казакбаева. – Текст : непосредственный // Точка зрения. Восток–Запад. – 2022. – № 1. – С.46-51.

20. Хубецова, М.Х. Технология получения сфероидов прогениторных клеток глазного лимба для трансплантации : специальность 14.01.07 «Глазные болезни», 14.01.24 «Трансплантология и искусственные органы» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Хубецова Мадина Хетаговна ; [Место защиты : Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России]. – Москва : ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова, 2017. – 132 с. – Текст : непосредственный.

21. Хубецова, М.Х. Характеристика 2D-культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток лимба, полученной с использованием бессывороточной питательной среды / М.Х. Хубецова, Д.С. Островский, С.А. Борзенко. – Текст : непосредственный // Современные технологии в офтальмологии. – 2020. – № 4. – С.267-268.

22. Черныш, В.Ф. Ожоги глаз – состояние проблемы и новые подходы: учебное пособие / В.Ф. Черныш, В.Ф. Бойко. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 184 с. – ISBN 978-5-9704-4184-8. – Текст : непосредственный.

23. Чупров, А.Д. Анатомия и физиология органа зрения : учебное пособие / А.Д. Чупров, Ю.В. Кудрявцева ; под общей редакцией А.Д. Чупрова – Киров : Кировская государственная медицинская академия, 2007. – 107 с. – URL: <https://zreni.ru/download/books/503-anatomiya-i-fiziologiya-organa-zreniya-ad-chuprov-yuv-kudryavceva.html> (дата обращения: 07.04.2023). – Текст : электронный.

24. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes / O. Baylis, F. Figueiredo, C. Henein [et al.]. – DOI: 10.1002/jcb.23028. – Text : electronic // Journal of Cellular Biochemistry. – 2011. – Vol. 112, N 4. – P.993-1002. – URL: <https://www.sci-hub.ru/10.1002/jcb.23028> (date of treatment : 07.04.2023).

25. A method for quantifying limbal stem cell niches using OCT imaging / M. Haagdoorens, J. Behaegel, J. Rozema [et al.]. – DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-309549. – Text : electronic // British Journal of Ophthalmology. –2017. – Vol. 101, N 9. – P. 1250-1255. – URL: <https://bjo.bmj.com/content/101/9/1250> (date of treatment : 07.04.2023).

26. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells / C.S. de Paiva, Z. Chen, R.M. Corrales [et al.]. – DOI: 10.1634/stemcells.2004-0093. – Text : electronic // Stem Cells. – 2005. – N 23, Iss. 1. – P. 63-73. – URL: <https://academic.oup.com/stmcls/article/23/1/63/6399596?login=false> (date of treatment : 07.04.2023).

27. Advanced imaging and tissue engineering of the human limbal epithelial stem cell niche / I. Massie, M. Dziasko, A. Kureshi [et al.]. – DOI: 10.1007/978-1-4939-1785-3_15. – Text : electronic // Methods in molecular biology. – 2015. – N 1235. – P. 179-202.

28. Application of Corneal Optical Coherence Tomography Angiography for Assessment of Vessel Depth in Corneal Neovascularization / A. Nanji, T. Redd, W. Chamberlain [et al.]. – DOI: 10.1097/ICO.0000000000002232. – Text : electronic // Cornea. – 2020. – Vol. 39, N 5. – P. 598-604.

29. Assessment of conjunctival goblet cell density using laser scanning confocal microscopy versus impression cytology / L.H. Colorado, Y. Alzahrani, N. Pritchard [et al.]. – DOI: 10.1016/j.clae.2016.01.006. – Text : electronic // Cont Lens Anterior Eye. – 2016. – Vol.39, Iss. 3. – P.221-226. – URL: [https://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484\(16\)30007-8/ful](https://www.contactlensjournal.com/article/S1367-0484(16)30007-8/ful) (date of treatment : 07.04.2023).

30. Autologous simple limbal epithelial transplantation for unilateral limbal stem cell deficiency: multicentre results / J. Vazirani, M.H. Ali, N. Sharma [et al.]. – DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-307348. – Text : electronic // British Journal of Ophthalmology. – 2016. – Vol. 100, N 10. – P.1416-1420.

31. Bachmann, B. Corneal neovascularization as a risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: an evidence-based meta-analysis / B. Bachmann, R.S. Taylor, C. Cursiefen. – DOI : 10.1016/j.ophttha.2010.01.039. – Text : electronic // Ophthalmology. – 2010. – Vol.117, N 7. – P. 1300-1305.

32. Basti, S. Ocular surface squamous neoplasia: a review / S. Basti, M.S. Macsai. – DOI:10.1097/00003226-200310000-00015. – Text : electronic // Cornea. – 2003. – Vol. 22, N 7. – P. 687-704.

33. Causes and risk factors for graft failure in surgeries performed by physicians in fellowship training / A.M. De Freitas, B.C. Melo, C.N. Mendonca [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ajo.2006.06.020. – Text : electronic // Cornea. – 2006. – Vol. 25, N 3. – P. 251-256. – URL: [https://www.ajo.com/article/S0002-9394\(06\)00716-1/fulltext](https://www.ajo.com/article/S0002-9394(06)00716-1/fulltext) (date of treatment : 07.04.2023).

34. CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes / A.E. Carpenter, T.R. Jones, M.R. Lamprecht [et al.]. – DOI: 10.1186/gb-2006-7-10-r100. – Text : electronic // Genome Biology. – 2006. – Vol. 7, N 10. – P. 100. – URL: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2006-7-10-r100> (date of treatment : 07.04.2023).

35. Chan, C. Several surgical approaches available for patients with limbal stem cell deficiency / C. Chan, E. Holland. – Text : electronic // Healio News. – 2013. – 1 August. – URL: https://www.healio.com/news/ophthalmology/20130809/10_3928_1081_597x_20130101_04_1303770 (date of treatment : 07.04.2023).

36. Chan, C.C. Severe limbal stem cell deficiency from contact lens wear: patient clinical features / C.C. Chan, E.J. Holland. – DOI:

10.1016/j.ajo.2012.09.013. – Text : electronic // American Journal of Ophthalmology. – 2013. – Vol. 155, N 3. – P. 544-549.

37. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment / U. Schlötzer-Schrehardt, T. Dietrich, K. Saito [et al.]. – DOI: 10.1016/j.exer.2007.08.020. – Text : electronic // Experimental Eye Research. – 2007. – Vol. 85, N 6. – P. 845-860.

38. Characterization of limbal stem cell deficiency by in vivo laser scanning confocal microscopy: a microstructural approach / S.X. Deng, K.D. Sejpal, Q. Tang [et al.]. – DOI: 10.1001/archophthalmol.2011.378. – Text : electronic // Archives of Ophthalmology. – 2012. – Vol.130, N 4. – P. 440-445.

39. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia / Z. Chen, C.S. de Paiva, L. Luo, [et al.]. – DOI: 10.1634/stemcells.22-3-355. – Text : electronic // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22, N 3. – P. 355-366. – URL:<https://academic.oup.com/stmcls/article/22/3/355/6404253?login=false> (date of treatment : 07.04.2023).

40. Characterization of the corneal subbasal nerve plexus in limbal stem deficiency / P. Chuephanich, C. Supiyaphun, C. Aravena [et al.]. – DOI: 10.1097/ICO.0000000000001092. – Text : electronic // Cornea. – 2017. – Vol. 36, N 3. – P. 347-352. – URL: <https://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/fullarticle/11509> (date of treatment : 07.04.2023).

41. Clinical and cytological findings in limbal stem cell deficiency / M. Sacchetti, A. Lambiase, M. Cortes [et al.]. – DOI: 10.1007/s00417-005-1159-0. – Text : electronic // Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. – 2005. – Vol. 243, N 9. – P. 870-876.

42. Comparative study of limbal stem cell deficiency diagnosis methods: detection of MUC5AC mRNA and goblet cells in corneal epithelium / I. Garcia, J. Etxebarria, A. Boto-de-Los-Bueis [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ophtha.2011.10.031. – Text : electronic // Ophthalmology. – 2012. – Vol. 119, N 5. – P. 923-929.

43. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes / A. Kabosova, D.T. Azar, G.A. Bannikov [et al.]. – DOI: 10.1167/iovs.07-0654. – Text : electronic // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2007. – Vol.48, Iss.11. – P. 4989-4999. – URL: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2183690> (date of treatment : 07.04.2023).

44. Conjunctival impression cytology in patients with normal and impaired OSDI scores / F. Zuazo, D. López-Ponce, D. Salinas-Toro [et al.]. – DOI:10.1016/j.oftal.2014.04.013. – Text : electronic // Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. – 2014. – Vol. 89, N 10. – P. 391-396.

45. Contact lens- induced limbal stem cell deficiency / J. Rossen, A. Amram, B. Milani [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jtos.2016.06.003. – Text : electronic // The Ocular Surface. – 2016. – Vol.14, N 4. – P. 419-434.

46. Corneal Epithelial Thickness Measured Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography as a Diagnostic Parameter for Limbal Stem Cell Deficiency / Q. Liang, Q. Le, D.W. Cordova [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ajo.2020.04.006. – Text : electronic // American Journal of Ophthalmology. – 2020. – N 216. – P. 132-139. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7434708/> (date of treatment : 07.04.2023).

47. Corneal graft rejection / A. Panda, M. Vanathi, A. Kumar [et al.]. – DOI: 10.1016/j.survophthal.2007.04.008. – Text : electronic // Surv. Ophthalmol. – 2007. – Vol.52, N 4. – P.375-396.

48. Correlation between the existence of the palisades of Vogt and limbal epithelial thickness in limbal stem cell deficiency / Q. Le, Y. Yang, S.X. Deng, J. Xy. – DOI: 10.1111/ceo.12832. – Text : electronic // Clinical and Experimental Ophthalmology. – 2017. – Vol.45, N 3. – P.224-231.

49. Correlation between the histological features of corneal surface pannus following ocular surface burns and the final outcome of cultivated limbal epithelial transplantation / A. Sati, S. Basu, V.S. Sangwan, G.K. Vemuganti, G.K. Vemuganti.

– DOI:10.1136/bjophthalmol-2014-305568. – Text : electronic // British Journal of Ophthalmology. – 2015. – Vol. 99, N 4. – P. 477-481.

50. Cruzat, A. In vivo confocal microscopy of corneal nerves : analysis and clinical correlation / A. Cruzat, D. Pavan-Langston, P. Hamrah. – DOI: 10.3109/08820538.2010.518133. – Text : electronic // Seminars in Ophthalmology. – 2010. – Vol. 25, N 5-6. – P. 171-177. – URL: <https://www.peeref.com/works/16694658> (date of treatment : 07.04.2023)

51. Cultivation and characterization of cornea limbal epithelial stem cells on lens capsule in animal material-free medium / R. Albert, Z. Veréb, K. Csomós [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0047187. – Text : electronic // PLoS One. – 2012. – N 7. – P.471-487. – URL: https://www.researchgate.net/publication/232233197_Cultivation_and_Characterization_of_Cornea_Limbal_Epith (date of treatment : 07.04.2023).

52. Current and Emerging Therapies for Limbal Stem Cell Deficiency / A.M. Elhusseiny, M. Soleimani, T.K. Eleiwa, [et al.]. – DOI: 10.1093/stcltm/szab028Stem. – Text : electronic // Cells Transl Med. – 2022. – Vol. 11, N 3. – P. 259-268.

53. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces / S. Yoshida, S. Shimmura, T. Kawakita [et al.]. – DOI: 10.1167/iovs.06-0574. – Text : electronic // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2006. – Vol. 47, N 11. – P.4780-4786.

54. Diagnostic Algorithm for Surgical Management of Limbal Stem Cell Deficiency / B. Malyugin; S. Kalinnikova; R. Isabekov [et al.]. – DOI: 10.3390/diagnostics13020199. – Text : electronic // Diagnostics. – 2023. N 13. – P. 199.

55. Dua, H.S. A new classification of ocular surface burns / H.S. Dua, A.J. King, A. Joseph. – DOI: 10.1136/bjo.85.11.1379. – Text : electronic // British Medical Association. – 2001. – Vol. 85, N 11. – P. 1379-1383. – URL: <https://bjo.bmj.com/content/85/11/1379> (date of treatment : 07.04.2023).

56. Dua, H.S. Clinical patterns of corneal epithelial wound healing / H.S. Dua, J.V. Forrester. – DOI : 10.1016/s0002-9394(14)74105-4. – Text : electronic //

American Journal of Ophthalmology. – 1987. – Vol. 104, N 5. – P. 481-489. – URL: [https://www.ajo.com/article/S0002-9394\(14\)74105-4/fulltext](https://www.ajo.com/article/S0002-9394(14)74105-4/fulltext) (date of treatment : 07.04.2023).

57. Dua, H.S. Stem cell differentiation and the effects of deficiency / H.S. Dua, A. Joseph, V.A. Shanmuganathan, R.E. Jones. – DOI: 10.1038/sj.eye.6700573. – Text : electronic // Eye (Lond). – 2003. – N 17. – P. 877-885. – URL: <https://www.nature.com/articles/6700573> (date of treatment : 07.04.2023).

58. Dua, H.S. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing / H.S. Dua. – Text : electronic // British Journal of Ophthalmology. – 1998. – Vol. 82, N 12. – P. 1407-1411. – URL: <https://bjournal.com/content/82/12/1407> (date of treatment : 07.04.2023).

59. Dua, H.S. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing / H.S. Dua, J.V. Forrester. – DOI: 10.1016/s0002-9394(14)77062-x. – Text : electronic // American Journal of Ophthalmology. – 1990. – Vol.110, Iss. 6. – P. 646-656. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000293941477062X> (date of treatment : 07.04.2023).

60. Effect of age and early intervention with a systemic steroid, intravenous immunoglobulin or amniotic membrane transplantation on the ocular outcomes of patients with Stevens-Johnson syndrome / K.H. Kim, S.W. Park, M.K. Kim, W. R. Wee. – DOI: 10.3341/kjo.2013.27.5.331. – Text : electronic // Korean Journal of Ophthalmology. – 2013. – Vol. 27, N 5. – P. 331-340.

61. Efficacy and outcome of simple limbal epithelial transplantation for limbal stem cell deficiency verified by epithelial phenotypes integrated with clinical evaluation / P. Prabhasawat, C. Chirapapaisan, P. Ngowyutagon [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jtos.2021.06.012. – Text : electronic // The Ocular Surface. – 2021. – N 22. – P. 27-37.

62. Efficacy of cultivated corneal epithelial stem cells for ocular surface reconstruction / P. Prabhasawat, P. Ekpo, M. Uiprasertkul [et al.]. – DOI:

10.2147/OPHTH.S33951. – Text : electronic // *Clinical ophthalmology*. – 2012. – N 6. – P.1483-92.

63. Efron, N. *Contact Lens Complications* / N. Efron. – 4th ed. – Oxford : Elsevier, 2018. – 366 p. – ISBN: 9780702078828. – Text : unmediated.

64. Egbert, P.R. *A simple conjunctival biopsy* / P.R. Egbert, S. Lauber, D.M. Maurice. – Text : electronic // *American Journal of Ophthalmology*. – 1977. – Vol. 84, N 6. – P. 789-801. – URL: <https://pdfslide.net/documents/a-simple-conjunctival-biopsy.html> (date of treatment : 07.04.2023).

65. *Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing* / S.E. Wilson, Y.G. He, J. Weng [et al.]. – Text : unmediated // *Experimental Eye Research*. – 1996. – Vol. 62, N 4. – P. 325-327.

66. Espana, E.M. *En face optical coherence tomography imaging of corneal limbal stem cell niche* // *Clinical En Face OCT Atlas* / E.M. Espana, A.R. Djalilian, S.H. Yoo [et al.]. – DOI: 10.5005/jp/books/11843_7. – Text : electronic // New Delhi : Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd. – 2013. – P.77-79.

67. *Evaluation of ocular surface disorders: a new diagnostic tool based on impression cytology and confocal laser scanning microscopy* / V. Barbaro, S. Ferrari, A. Fasolo [et al.]. – DOI: 10.1136/bjo.2009.164152. – Text : electronic // *British Journal of Ophthalmology*. – 2010. – Vol.94, N 7. – P. 926-932. – URL: <https://bjo.bmj.com/content/94/7/926> (date of treatment : 07.04.2023).

68. *Existence of normal limbal epithelium in eyes with clinical signs of total limbal stem cell deficiency* / E. Chan, Q. Le, A. Codriansky [et al.]. – DOI: 10.1097/ICO.0000000000000914. – Text : electronic // *Cornea*. – 2016. – Vol.35, N 11. – P.1483-1487.

69. *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis* / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise [et al.]. – DOI:10.1038/nmeth.2019. – Text : electronic // *Nature Methods*. – 2012. – Vol. 9, N 7. – P. 676-682.

70. *Gipson, I.K. The ocular surface: The challenge to enable and protect vision: The Friedenwald lecture* / I.K. Gipson. – DOI: 10.1167/iovs.07-0770. – Text

: electronic // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2007. – Vol. 48, N 10. – P. 4390-4391.

71. Global Consensus on Definition, Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency / S.X. Deng, V. Borderie, C.C. Chan [et al.]. – DOI: 10.1097/ICO.0000000000001820. – Text : electronic // Cornea. – 2019. – Vol.38, N 3. – P. 364-375. – URL: https://www.academia.edu/73080742/Global_Consensus_on_Definition_Classification_Diagnosis_and_Staging_of_Limbal_Stem_Cell_Deficiency (date of treatment : 07.04.2023).

72. Goblet cell density in thermal and chemical injuries / M. Ohji, G. Ohmi, A. Kiritoshi, S. Kinoshita. – DOI: 10.1001/archophth.1987.01060120084031. – Text : electronic // Arch Ophthalmol. – 1987. – Vol. 105, N 12. – P. 1686-1688.

73. Graft failure in human donor corneas due to transmission of herpes simplex virus / S. Biswas, P. Suresh, R.E. Bonshek [et al.]. – DOI: 10.1136/bjo.84.7.701. – Text : electronic // British Journal Of Ophthalmology. – 2000. – Vol. 84, N 7. – P. 701-705. – URL: <https://bjo.bmj.com/content/bjophthalmol/84/7/701.full.pdf> (date of treatment : 07.04.2023).

74. Guilbert, E. Rejection of corneal allografts / E. Guilbert, L. Laroche, V. Borderie – DOI: 10.1016/j.jfo.2011.02.001. – Text : electronic // Journal Français D'ophtalmologie. – 2011. – Vol.34, N 5. – P.331-348.

75. Guillon, M. Bulbar conjunctival staining in contact lens wearers and non lens wearers and its association with symptomatology / M. Guillon, C. Maissa. – DOI: 10.1016/j.clae.2005.02.002. – Text : electronic // Contact Lens Anterior Eye. – 2005. – Vol.28, N 2. – P. 67-73.

76. High-Resolution Optical Coherence Tomography Angiography Characteristics of Limbal Stem Cell Deficiency / S. Varma, S.S. Shanbhag, P.R. Donthineni [et al.]. – DOI: 10.3390/diagnostics11061130. – Text : electronic // Diagnostics. – 2021. – Vol. 11, N 6. – P. 1130.

77. Hill, J.C. The relative importance of risk factors used to define high-risk keratoplasty / J.C. Hill. – Text : unmediated // German Journal of Ophthalmology. – 1996. – Vol. 5, N 1. – P. 36-41.

78. Holland, E.J. Management of aniridic keratopathy with keratolimbal allograft: a limbal stem cell transplantation technique / E.J. Holland, A.R. Djalilian, G.S. Schwartz. – DOI: 10.1016/s0161-6420(02)01451-3. – Text : electronic // Ophthalmology. – 2003. – Vol.110, N 1. – P.125-130.

79. Holland, E.J. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system / E.J. Holland, G.S. Schwartz. – Text : unmediated // Cornea. – 1996. – Vol.15, N 6. – P. 549-556.

80. Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms / A.V. Ljubimov, R.E. Burgeson, R.J. Butkowski [et al.]. – Text : unmediated // Laboratory investigation. – 1995. – Vol. 72, Iss. 4. – P. 461-473.

81. Imaging and quantification of subbasal nerve plexus in healthy volunteers and diabetic patients with or without retinopathy / A. Zhivov, K. Winter, M. Hovakimyan [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0052157. – Text : electronic // PLoS One. – 2013. – Vol.8, N 1. – P. 52157.

82. Immunocytochemical diagnosis of limbal stem cell deficiency: comparative analysis of current corneal and conjunctival biomarkers / M. Poli, C. Burillon, C. Auxenfans [et al.]. – DOI: 10.1097/ICO.0000000000000457. – Text : electronic // Cornea. – 2015. – Vol.34, N 7. – P.817-823. <https://journals.lww.com/corneajrnl/Abstract/2015/07000/Immunocytochem> (date of treatment : 07.04.2023).

83. Immunology of Corneal Transplantation / ed: M. Zierhut, U. Pleyer, H.J. Thiel. – Amsterdam : Aeolus Press, 1994. – P.233-238. – ISBN 907043007X. – Text : unmediated.

84. Impression cytology of the ocular surface / R. Singh, A. Joseph, T. Umapathy [et al.] // British Journal of Ophthalmology. – 2005. – Vol. 89, N 12. – P. 1655-1659.

85. In vitro culture and expansion of human limbal epithelial cells / I. Mariappan, S. Maddileti, S. Savy [et al.]. – DOI: 10.1038/nprot.2010.115. – Text : electronic // Nature protocols. – 2010. – N 5. – P. 1470-1479.

86. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells / Z.G. Wei, R.L. Wu, R.M. Lavker, T.T. Sun. – Text : unmediated // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 1993. – N 34, N 5. – P.1814-1828.

87. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal changes in chronic Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis / L.S. Vera, J. Gueudry, A. Delcampe [et al.]. – DOI: 10.1097/ICO.0b013e31818cd299. – Text : electronic // Cornea. – 2009. – Vol. 28, N 4. – P. 401-407.

88. In vivo confocal microscopic features of normal limbus / A. Miri, M. Al-aqaba, A. Otri [et al.]. – DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300550. – Text : electronic // British Journal of Ophthalmology. – 2012. – Vol. 96, N 4. – P. 530-536.

89. In vivo confocal microscopy assessment of the corneoscleral limbal stem cell niche before and after biopsy for cultivated limbal epithelial transplantation to restore corneal epithelium / B.E Ramírez, D.A Victoria, G.M Murillo [et al.]. – DOI: 10.14670/HH-30.183. – Text : electronic // Histology and Histopathology. – 2015. – Vol.30, N 2. – P.183-192.

90. In vivo confocal microscopy in diagnosis of limbal stem cell deficiency / M. Nubile, M. Lanzini, A. Miri [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ajo.2012.08.017. – Text : electronic // American Journal of Ophthalmology. – 2013. – Vol. 155, N 2. – P. 220-232.

91. In vivo volumetric imaging of the human corneo-scleral limbus with spectral domain OCT / K. Bizheva, N. Hutchings, L. Sorbara [et al.]. – DOI: 10.1364/BOE.2.001794. – Text : electronic // Biomedical Optics Express. – 2011. – Vol.2, N 7. – P. 1794-1802.

92. In-vivo imaging of the palisades of Vogt and the limbal crypts with sub-micrometer axial resolution optical coherence tomography / K. Bizheva, B. Tan, B.

MacLellan [et al.]. – DOI: 10.1364/BOE.8.004141. – Text : electronic // Biomedical Optics Express. – 2017. – Vol.8, N 9. – P. 4141-4151.

93. Jeng, B.H. Autologous serum 50% eyedrops in the treatment of persistent corneal epithelial defects / B.H. Jeng, Jr. Dupps. – DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181a2a7f6. – Text : electronic // Cornea. – 2009. – Vol. 28, N 10. – P.1104-1108. – URL: <https://www.sci-hub.ru/10.1097/ICO.0b013e3181a2a7f6> (date of treatment : 07.04.2023).

94. Jia, Y. Quantitative optical coherence tomography angiography of vascular abnormalities in the living human eye / Y. Jia, S.T. Bailey, T.S. Hwang [et al.]. – DOI : 10.1073/pnas.1500185112. – Text : electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2015. – Vol. 112, N 18. – P. 2395-2402.

95. Joe, A.W. Concise review: identifying limbal stem cells: classical concepts and new challenges / A.W. Joe, S.N. Yeung. – DOI :10.5966/sctm.2013-0137. –Text : electronic // Stem Cells International medicine. – 2014. – Vol. 3, N 3. – P. 318-322. – URL: <https://stemcellsjournalsonlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.5966/sctm.2013-0137> (date of treatment : 07.04.2023).

96. Kasper, M. Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye / M. Kasper, R. Moll, P. Stosiek, U. Karsten. – DOI: 10.1007/BF00500639. – Text : electronic // Histochemistry. – 1988. – Vol.89, N 4. – P. 369-377.

97. Keratin 13 Immunostaining in Corneal Impression Cytology for the Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency / M. Poli, H. Janin, V. Justin [et al.]. – DOI: 10.1167/iovs.10-7049. – Text : electronic // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2011. – Vol. 52, N 13. – P. 9411-9415.

98. Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19 / A. Ramirez-Miranda, M.N. Nakatsu, S. Zarei-Ghanavati [et al.]. – Text : unmediated // Molecular Vision. – 2011. – N 17. – P. 1652-1661.

99. Keratolimbal allograft in corneal reconstruction / E. Espana, M. Di Pascuale, M. Grueterich [et al.]. – DOI: 10.1038/sj.eye.6700670. – Text : electronic

// Eye. – 2004. – N 18. – P. 406-417. – URL: <https://www.nature.com/articles/6700670> (date of treatment : 07.04.2023).

100. Khodadoust, A.A. The rate of corneal rejection after previous rejection reaction // Immunology and Immunopathology of the Eye / A.A. Khodadoust, A. AbKizadeh. – New York : Masson Pub. – 1979. – P. 271-283. – ISSN 2500-0845. – Text : unmediated.

101. Krenzer, K.L. Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by impression cytology / K.L Krenzer, T.F. Freddo. – Text : unmediated // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 1997. – Vol. 38, N 1. – P. 142-52.

102. Lagali, N. Laser-Scanning in vivo ConfocalMicroscopy of the Cornea: Imaging and Analysis Methods for Preclinical and Clinical Applications // Confocal Laser Microscopy. – New York : Intechopen, 2013. – P. 51-80. – ISBN: 978-953-51-1056-9. – Text : unmediated.

103. Lakkis, C. Bulbar conjunctival fluorescein staining in hydrogel contact lens wearers / C. Lakkis, N.A. Brennan. – Text : unmediated // CLAO Journal. – 1996. – N 22. – P. 189-194.

104. Le, Q. Diagnostic criteria for limbal stem cell deficiency prior to surgical intervention - A systematic literature review and analysis / Q. Le, T. Chauhan, S.X. Deng / DOI: 10.1016/j.survophthal.2019.06.008. – Text : electronic // Survey of Ophthalmology. – 2020. – Vol.65, N 1. – P.32-40.

105. Le, Q. The diagnosis of limbal stem cell deficiency / Q Le, J. Xu, S. X. Deng. – DOI :10.1016/j.jtos. – Text : electronic // The Ocular Surface. – 2018. – Vol.16, N 1. – P. 58-69.

106. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management / H.S. Dua, J.S. Saini, A. Azuara-Blanco, P. Gupta. – Text : electronic // Indian Journal of Ophthalmology. – 2000. – N 48. – P. 83-92. – URL: <https://www.ijo.in/article.asp?issn=0301-4738;year=2000;vo> (date of treatment : 07.04.2023).

107. Limbal stem cell deficiency: current treatment options and emerging therapies / M. Haagdoorens, Van Acker SI, Van Gerwen V [et al.]. – DOI:10.1155/2016/9798374. – Text : electronic // Stem Cells International. – 2016. – P: 9798374. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/9798374/> (date of treatment : 07.04.2023).

108. Limbal stem- cell therapy and long-term corneal regeneration / P. Rama, S. Matuska, G. Paganoni [et al.]. – DOI: 10.1056/NEJMoa0905955 // New England Journal of Medicine. – 2010. – Vol.363, N 2. – P.147-155.

109. Lipid Keratopathy : A Review of Pathophysiology, Differential Diagnosis, and Management / M.N. Hall, M. Moshirfar, A. Amin-Javaheri [et al.]. – DOI:10.1007/s40123-020-00309-y. – Text : electronic // Ophthalmology and Therapy. – 2020. – Vol. 9, N 4. – P. 833-852.

110. Ljubimov, A.V. Progress in corneal wound healing / A.V. Ljubimov, M. Saghizadeh. – DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.002. – Text : electronic // Progress in Retinal and Eye Research. – 2015. – Vol. 49. – P. 17-45.

111. Lum, E. Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in orthokeratology lens wear using in vivo laser scanning confocal microscopy / E. Lum, B. Golebiowski, H.A. Swarbrick. – DOI: 10.1167/iovs.11-8706. – Text : electronic // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2012. – Vol. 53, N 4. – P. 1803-1809.

112. Malozhen, S.A. Pterygium: etiology, pathogenesis, treatment / S.A. Malozhen, S.V. Trufanov, D.A. Krakhmaleva. – DOI:10.17116/oftalma2017133576-83. – Text : electronic // Vestn Oftalmol. – 2017. – Vol. 133, N 5. – P.76-83.

113. Malyugin, M. Glueless Simple Limbal Epithelial Transplantation: The Report of the First 2 Cases / B.E. Malyugin, M.Y. Gerasimov, S.A. Borzenok. – DOI: 10.1097/ICO.0000000000002467. – Text : electronic // Cornea. – 2020. – Vol. 39, N 12. – P. 1588-1591. – URL: <https://journals.lww.com/corneajrnl/Abstract/2020/12000/Glue> (date of treatment : 07.04.2023).

114. Maskin, S.L. Electron microscopy of impression-acquired conjunctival epithelial cells / S.L. Maskin, D.D. Bode. – DOI: 10.1016/s0161-6420(86)33538-3. – Text : electronic // *Ophthalmology*. – 1986. – Vol. 93, N 12. – P.1518-23.

115. Matrix metalloproteinase content and activity in low-platelet, low-leukocyte and high-platelet, high-leukocyte platelet rich plasma (PRP) and the biologic response to PRP by human ligament fibroblasts / M.A. Pifer, T. Maerz, K.C. Baker, K. Anderson. – DOI: 10.1177/0363546514524710. – Text : electronic // *American Orthopaedic Society for Sports Medicine*. – 2014. – Vol. 42, N 5. – P.1211-1218.

116. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: Implications for surgical outcomes / B.M. Stramer, J.D. Zieske, J. Jung. [et al.]. – DOI: 10.1167/iovs.02-1188. – Text : electronic // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 2003. – Vol.44, N 10. – P. 4237-4246.

117. Moll, R. The human keratins: biology and pathology / R. Moll, M. Divo, L. Langbein. – DOI:10.1007/s00418-008-0435-6. – Text : electronic // *Histochemistry and cell biology*. – 2008. – Vol 129, N 6. – P. 705-733.

118. Multipotent stem cells in human corneal stroma / Y. Du, M.L. Funderburgh, M.M. Mann [et al.]. – DOI: 10.1634/stemcells.2004-0256. –Text : electronic // *Stem Cells*. – 2005. – Vol. 23, N 9. – P. 1266-1275. – <https://academic.oup.com/stmcls/article/23/9/1266/6399870?login=false> (date of treatment : 07.04.2023).

119. Norn, M.S. Fluorescein vital staining of the cornea and conjunctiva / M.S. Norn. – Text : unmediated // *Acta Ophthalmol (Copenh)*. – 1964. – N 42. – P. 1038-1045.

120. O'Callaghan, A.R. Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies and challenges / A.R. O'Callaghan, J.T. Daniels. – DOI:10.1002/stem.756 // *Stem Cells*. – 2011. – Vol. 29, N 12. – P.1923-1932.

121. Ocular surface changes in limbal stem cell deficiency caused by chemical injury: a histologic study of excised pannus from recipients of cultured corneal epithelium / A. Fatima, G. Iftekhhar, V.S. Sangwan, G K Vemuganti. – DOI:

10.1038/sj.eye.6702895. – Text : electronic // Eye (Lond.). – 2008. – N 9. – P. 1161-1167. – URL: https://www.nature.com/articles/6702895?error=cookies_not_supported&code=d9ab21cb-5a98-4797-882c-339b7f2728cb (date of treatment : 07.04.2023).

122. Oie, Y. Evaluation of Corneal Neovascularization Using Optical Coherence Tomography Angiography in Patients With Limbal Stem Cell Deficiency / Y. Oie, K. Nishida. – DOI: 10.1097/ICO.0000000000001382.–Text : electronic // Cornea. – 2017. – N 36, Sup. 1. – P.72-75.

123. Ophthalmic Pathology an atlas and textbook / W.H. Spencer, L.E. Zimmerman, W.H. Spencer (ed.). – Philadelphia : PA. – 1985. – Vol 1. – P. 174-175. – Text : unmediated.

124. Optical coherence tomography angiography for anterior segment vasculature imaging / M. Ang, D.A. Sim, P.A. Keane [et al.]. – DOI: 10.1016/j.optha.2015.05.017. – Text : electronic // Ophthalmology. – 2015. – Vol.122, N 9. – P.1740-1747. – URL: https://www.researchgate.net/publication/330808656_Optical_coherence_tomography_angiography_for_the_anterior_segment (date of treatment : 07.04.2023).

125. Optical coherence tomography in cultivated limbal epithelial stem cell transplantation surgery / N. Zakaria, S. Ni Dhubhghaill, M. Taal [et al.]. – DOI: 10.1097/APO.0000000000000163. – Text : electronic // Asia-Pacific Journal of Ophthalmology. – 2015. – Vol.4, N 6. – P. 339-345.

126. Outcome of corneal transplant rejection: a 10-year study / V.S. Sangwan, B. Ramamurthy, U. Shah [et al.]. – DOI: 10.1111/j.1442-9071.2005.01107.x. – Text : electronic // Clinical and Experimental Ophthalmology. – 2005. – Vol. 33, N 6. – P. 623-627.

127. Patel, D. Laser scanning in vivo confocal microscopy of the normal human corneoscleral limbus / D. Patel, T. Sherwin, C.N. Mcghee. – DOI: 10.1167/iovs.05-1492. – Text : electronic // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2006. – Vol.47, N 7. – P. 2823-2827.

128. Pellegrini, G. p63 identifies keratinocyte stem cells / G. Pellegrini, E. Dellambra, O. Golisano [et al.]. – DOI: 10.1073/pnas.061032098. – Text : electronic // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2001. – Vol.98, N 6. – P. 3156-3161.

129. Persistent Corneal Epithelial Defects: A Review Article / U. Vaidyanathan, G.C. Hopping H.Y. Liu [et al.]. – Text : unmediated // Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol. – 2019. – Vol. 8, N 3. – P. 163-176.

130. Piatigorsky, J. Enigma of the abundant water-soluble cytoplasmic proteins of the cornea: The «refracton» hypothesis / J. Piatigorsky. – DOI: 10.1097/00003226-200111000-00015. – Text : electronic // Cornea. – 2001. – Vol.20, N 8. – P. 853-858.

131. Polisetty, N. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye / N. Polisetty, A. Fatima, S.L. Madhira – Text : unmediated // Molecular vision. – 2008. – Vol.4, N 14. – P. 431-442.

132. Prabhasawat, P. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane / P. Prabhasawat, S.C.Tseng. – DOI : 10.1001/archophth.1997.01100160530001. – Text : electronic // Archives of Ophthalmology. – 1997. – Vol.115, N 11. – P.1360-1367.

133. Pretransplant and posttransplant antibodies in human corneal transplantation / R. Roy, H.M. Boisjoly, E. Wagner [et al.]. – DOI: 10.1097/00007890-199209000-00015. – Text : electronic // Transplantation. – 1992. – Vol. 54, N 3. – P. 463-467.

134. Puangsricharn, V. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency / V. Puangsricharn, S.C. Tseng. – DOI: 10.1016/s0161-6420(95)30842-1. – Text : electronic // Ophthalmology. – 1995. – Vol.102, N 10. – P. 1476-1485. – URL: [https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420\(95\)30842-1/fulltext](https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420(95)30842-1/fulltext) (date of treatment : 07.04.2023).

135. Ramaesh, K. Evolving concepts on the pathogenic mechanisms of aniridia related keratopathy / K. Ramaesh, T. Ramaesh, G.N. Dutton, B. Dhillon. –

DOI: 10.1016/j.biocel.2004.09.002. – Text : electronic // International Journal of Ophthalmology. – 2005. – Vol.37, N 3. – P.547-557.

136. Results of a phase I/II clinical trial: standardized, non-xenogenic, cultivated limbal stem cell transplantation / N. Zakaria, T. Possemiers, S.N. Dhuhghaill [et al.]. – DOI: 10.1186/1479-5876-12-58. – Text : electronic // Journal of Translational Medicine. – 2014. – N 12. – P.58.

137. Retrospective evaluation of risk factors for graft rejection in patients after corneal transplantation performed at the Eye Clinic in the years 2001-2003 / A. Kaminska, J. Szaflik, G. Minkiewicz-Timler. – Text : unmediated // Klinika Oczna. – 2005. – Vol. 107, N 4-6. – P. 209-211.

138. Risk factors for corneal graft failure and rejection in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies / M.G. Maguire, W.J. Stark, J.D. Gottsch [et al.]. – DOI: 10.1016/s0161-6420(94)31138-9. – Text : electronic // Ophthalmology. – 1994. – Vol. 101, N 9. – P.1536-1547. – URL: [https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420\(94\)31138-9/pdf](https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420(94)31138-9/pdf) (date of treatment : 07.04.2023).

139. Saika, S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha / S. Saika. – DOI: 10.1097/ICO.0b013e31812f6d14. – Text : electronic // Cornea. – 2007. – N 9. Sup. 1. – P. 70-74.

140. Sangwan, V.S. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study / V.S. Sangwan, S. Basu, G.K. Vemuganti. – DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300352. – Text : electronic // British Journal of Ophthalmology. – 2011. – Vol. 95, N 11. – P.1525-1529. – URL: <https://bjo.bmj.com/content/95/11/1525> (date of treatment : 07.04.2023).

141. Sejpal, K. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency / K. Sejpal, P. Bakhtiari, S. Deng. – DOI: 10.4103/0974-9233.106381. – Text : electronic // Middle East African Council of Ophthalmology. – 2013. – Vol. 20, N 1. – P. 5-10.

142. Shimazaki, J. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns / J. Shimazaki, H. Yang,

K. Tsubota. – DOI: 10.1016/s0161-6420(97)30057-8. – Text : electronic // *Ophthalmology*. – 1997. – N 104. – P. 2068-2076.

143. Simple Limbal Epithelial Transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency / V.S. Sangwan, S. Basu, S. MacNeil, D. Balasubramanian. – DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-301164. – Text : electronic // *British Journal of Ophthalmology*. – 2012. – N 96. – P. 931-934.

144. Simple Limbal Epithelial Transplantation: Long-Term Clinical Outcomes in 125 Cases of Unilateral Chronic Ocular Surface Burns / S. Basu, S.P. Sureka, S.S. Shanbhag [et al.]. – DOI: 10.1016/j.opht.2015.12.042. – Text : electronic // *Ophthalmology*. – 2016. – Vol. 123, N 5. – P. 1000-1010. – URL: <https://core.ac.uk/download/pdf/82760716.pdf> (date of treatment : 07.04.2023).

145. Spectral domain optical coherence tomography in limbal stem cell deficiency: A case control study / N. Banayan, C. Georgeon, K. Grieve, V. M. Borderie. – DOI: 10.1016/j.ajo.2018.03.034. – Text : electronic // *American Journal of Ophthalmology*. – 2018. – N 190. – P.179-190.

146. Strategies for reconstructing the limbal stem cell niche / G. Yazdanpanah, Z. Haq, K. Kang [et al.]. – DOI: 10.1016/j.jtos.2019.01.002. – Text : electronic // *Ocul Surf*. – 2019. – Vol.17, N 2. – P. 230-240.

147. Systemic cyclosporine A in high failure risk, repeated corneal transplantation / S. Rumelt, V. Bersudsky, T. Blum-Hareuveni, U. Rehany. – DOI: 10.1136/bjo.86.9.988. – Text : electronic // *British Journal of Ophthalmology*. – 2002. – Vol. 86, N 9. – P. 988-992. – URL: <https://bjo.bmj.com/content/bjophthalmol/86/9/992.full.pdf> (date of treatment : 07.04.2023).

148. The OV-TL 12/30 clone of anti-cytokeratin 7 antibody as a new marker of corneal conjunctivalization in patients with limbal stem cell deficiency / K. Jirsova, L. Dudakova, S. Kalasova [et al.]. – DOI: 10.1167/iovs.10-6748. – Text : electronic // *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. – 2011. – Vol.52, N 8. – P. 5892-5898.

149. The utility of anterior segment optical coherence tomography angiography for the assessment of limbal stem cell deficiency / W.W. Binotti, R.M. Nosé, N.D. Koseoglu. – DOI: 10.1016/j.jtos.2020.04.007. – Text : electronic // Ocular Surface. – 2021. – N 19. – P. 94-103.

150. Therapeutic effect of secretome from TNF- α stimulated mesenchymal stem cells in an experimental model of corneal limbal stem cell deficiency / G.H. Di, X. Qi, J. Xu [et al.]. – DOI: 10.18240/ijo.2021.02.01. – Text : electronic // International Journal of Ophthalmology. – 2021. – Vol. 14, N 2. – P. 179-185. – URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/a73b/18cfdaad05e057c6d2d57cf3d614740669e2.pdf> (date of treatment : 07.04.2023).

151. Thoft, R.A. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance / R.A. Thoft, J. Friend. – Text : unmediated // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 1983. – Vol. 24, N 10. – P. 1442-1443.

152. Tseng, S.C. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology / S.C. Tseng. – DOI: 10.1016/s0161-6420(85)33967-2. – Text : electronic // Ophthalmology. – 1985. – Vol. 92, N 6. – P. 728-733.

153. Understanding Ocular Surface Inflammation in Tears Before and After Autologous Cultivated Limbal Epithelial Stem Cell Transplantation / G.S. Figueiredo, J. Hogg, A. Okonkwo [et al.]. – DOI:10.1007/s40123-023-00656-6. – Text : electronic // Ophthalmology and Therapy. – 2023. – Vol.12, N 2. – P.1097-1107.

154. Vadrevu, V.L. Enhancements to the conjunctival impression cytology technique and examples of applications in a clinico- biochemical study of dry eye / V.L. Vadrevu, R.J. Fullard. – Text : unmediated // CLAO Journal. – 1994. – Vol. 20, N 1. – P. 59-63.

155. Vimentin as a Marker of Early Differentiating, Highly Motile Corneal Epithelial Cells / F. Castro-Muñozledo, D.G. Meza-Aguilar, R. Domínguez-Castillo [et al.]. – DOI: 10.1002/jcp.25487. – Text : electronic // Journal of Cellular Physiology. – 2017. – Vol. 232, N 4. – P. 818-830.

156. Wang, Y. Application of in vivo laser scanning confocal microscopy for evaluation of ocular surface diseases: lessons learned from pterygium, meibomian gland disease, and chemical burns / Y. Wang, Q. Le, F. Zhao [et al.]. – DOI: 10.1097/ICO.0b013e31824bd094. – Text : electronic // Cornea. – 2012. – Vol. 31, N 8. – P.968.

157. Wang, Y. ZO-1 in corneal epithelium; stratal distribution and synthesis induction by outer cell removal / Y. Wang, M. Chen, J.M. Wolosin. – Text : unmediated // Experimental Eye Research. – 1993. – Vol. 57, N 3. – P. 283-292.