

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора медицинских наук профессора Куликова Алексея Николаевича на диссертационную работу Калининковой Светланы Юрьевны «Экспериментально-клиническое обоснование новой технологии реконструкции эпителия роговицы у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.5 – Офтальмология и 3.1.14 – Трансплантология и искусственные органы.

### **Актуальность темы**

Диссертационная работа Калининковой С.Ю. посвящена изучению одностороннего синдрома лимбальной недостаточности (СЛН) – довольно частой патологии глазной поверхности, связанной, в первую очередь, – с отсутствием эпителизации роговицы вследствие дисфункции или снижении количества стволовых прогениторных клеток лимба. Причинами развития СЛН нередко выступают не только ожоги глаз различной этиологии, но и травмы, инфекционные заболевания (кератиты), обширная хирургия в области лимба, облучения и многие др. Хирургическое лечение одностороннего СЛН на протяжении ряда десятилетий сводится к трансплантации лимбальных стволовых клеток. Все существующие технологии трансплантации можно разделить в зависимости от донора лимбальных стволовых клеток на аутологичные, аллогенные или взятые из кадаверного глаза, тоже самое касается и технологии культивирования клеток. Однако, известно, что только аутоотрансплантация является наиболее безопасной и эффективной так как не требует донорского материала и длительной иммуносупрессивной терапии. Культивирование клеток весьма эффективная технология, однако данная процедура запрещена на территории РФ, требует специального оборудования и является дорогостоящей. На сегодняшний день наиболее часто используется технология SLET, предложенная относительно недавно, она предполагает иссечение фрагмента лимба со здорового глаза, его деление на мелкие части и приклеивание полученных аутоотрансплантатов к поверхности роговицы с помощью фибринового клея. Однако, использование клея также недоступно на территории нашей страны. Имеются данные о проведении операций по трансплантации конъюнктивно-лимбального (CLAU) или кератолимбального аутоотрансплантата (KLAU), однако известно, что данные техники являются высокотравматичными и нередко приводят к развитию ятрогенного СЛН на здоровом глазу. Данное обстоятельство обуславливает актуальность поиска наиболее эффективных и альтернативных технологий трансплантации лимба, формировании единого подхода к выбору диагностики и тактике лечения.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Работа построена логично. Методологически верно определены цель и задачи исследования. Диссертационная работа выполнена на достаточном количестве экспериментального и клинического материала, с применением современных клиничко-диагностических методов исследования. Глубокий

анализ данных с использованием методов математической статистики подтверждает достоверность исследования, обоснованность и аргументированность выносимых на защиту положений, выводов и практических рекомендаций и имеют несомненное научное и практическое значение.

Диссертационная работа посвящена разработке технологий реконструкции эпителия роговицы на основании предложенных методов диагностики и хирургического лечения одностороннего СЛН. В ходе исследования разработаны модификации технологии G-SLET (лимбальной послойной кератопластики), предложен алгоритм выбора диагностики и хирургического лечения, проведен полный анализ послеоперационных результатов. По теме диссертации опубликованы 5 печатных работ, из них 3 – в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, и 2 статьи – в журналах, входящих в международную базу данных «Scopus», также получены 5 патентов РФ и 3 заявки на изобретение.

Работа прошла апробацию на конференциях, конгрессах Всероссийского и международного уровней.

#### **Достоверность и новизна результатов исследования**

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации под руководством доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондент РАН, академика РАЕН, заслуженного деятеля науки РФ, заместителя генерального директора по научной работе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Малюгина Бориса Эдуардовича, а также под руководством доктора медицинских наук, академика РАЕН, профессора кафедры глазных болезней ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, руководителя Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», Минздрава России Борзенка Сергея Анатольевича.

Все научные положения обоснованы достаточным количеством клинического материала (24 пациента). Высокий методологический уровень обеспечивает достоверность научных положений и практических рекомендаций. Диссертационная работа выполнена с применением современных клиничко-лабораторных методов исследования (иммуоферментный анализ, иммуногисто- и иммуноцитохимическое исследование, оптическая когерентная томография переднего отрезка глаза, оптическая когерентная томография – ангиография).

Диссертант принимала непосредственное участие в постановке задач исследования и разработке научной концепции, осуществляла сбор материала для исследования, лично выполняла инструментальные методы диагностики.

Автором сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

На основании полученных данных диссертантом сформулированы и аргументированы выводы, практические рекомендации и основные положения, выносимые на защиту, которые имеют научное и практическое значение и являются логическим завершением работы.

По результатам исследования диссертант опубликовала научные работы в отечественной и зарубежной литературе; полученные результаты представлены на всероссийских и международных научных конференциях.

Автореферат полностью отражает основные положения диссертации.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Диссертационное исследование Калинниковой С. Ю. носит прикладную и практическую направленность, являясь перспективным для внедрения в клиническую офтальмологическую практику.

Выявленные закономерности могут способствовать разработке новых подходов в диагностике и лечении одностороннего синдрома лимбальной недостаточности.

Представленные в диссертационной работе результаты экспериментальных исследований по оценке фено- и иммунофенотипа клеток из лимбальных трансплантатов и проведение моделирования процессов ре-эпителизации по поверхности стромы и Боуеновой мембраны на кадаверных роговицах экспериментально обосновывают эффективность предложенных технологий лечения.

Автором было доказано, что цитокиновый профиль слезной жидкости имеет высокую корреляционную связь с этиологией возникновения СЛН, а также были определены сроки с наибольшей концентрацией провоспалительных цитокинов у пациентов.

Впервые на практике, автором был разработан протокол иммуноцитохимического исследования мазков-отпечатков с поверхности роговицы с определением наиболее специфического для конъюнктивы и роговицы кератина. Так же были разработаны и апробированы на практике новые варианты хирургической техники простой бесклеевой лимбальной эпителиальной трансплантации.

Разработанные пошаговые алгоритмы дооперационной диагностики и тактики хирургического лечения пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности могут быть использованы в качестве нормативов для дальнейших исследований, проводимых по описанной методике.

Практическая и научная значимость работы определена внедрением основных положений диссертации в деятельность головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава Российской Федерации. 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.

### **Оформление диссертации и оценка ее содержания**

Диссертационная работа имеет классическую структуру и изложена на 194 листах компьютерного 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 23 отечественных и 134 иностранных.

Во введении автор четко формулирует актуальность, цель исследования, основные задачи в логической последовательности для достижения поставленной цели.

**Обзор литературы** посвящен описанию анатомии эпителиального слоя роговицы, строению лимба и особенностям регенерации и миграции стволовых клеток лимба, причинам развития синдрома лимбальной недостаточности. Также освещаются основные звенья патогенеза, особенности клинической картины, детально описываются все существующие методы функциональной и лабораторной диагностики, такие как: оптическая когерентная томография переднего отрезка, ОКТ-ангиография роговицы, конфокальная микроскопия, гистологическое исследование и импрессионная цитология мазков-отпечатков. Описываются существующие на сегодняшний день зарубежные методы хирургического лечения. Отдельное внимание соискатель уделяет раскрытию вопроса о малой осведомленности врачей о данной патологии, схожести биомикроскопической картины заболевания с другими патологиями глазной поверхности, а также существенным недостаткам предложенных методов лечения, основанных на пересадке или культивировании стволовых клеток лимба. При этом соискатель приходит к заключению, что, несмотря на признанную высокую эффективность некоторых предложенных методик лечения, они являются недоступными на территории РФ. В связи с чем, автор ставит перед собой задачи разработки технологий аутологичной трансплантации стволовых клеток лимба здорового глаза, создание единого диагностического алгоритма, анализ отдаленных клинических результатов с последующим внедрением в широкую клиническую практику.

**Во второй** главе автор описывает дизайн исследования, включающий в себя экспериментальную и клиническую части. Экспериментальное исследование *ex vivo* было направлено на: изучение процессов ре-эпителизации на модельных кадаверных роговицах, а именно, особенности роста клеток на поверхности стромы и Боуменовой мембраны; культивирование лимбальных трансплантатов на различных средах для определения фено- и иммунофенотипа и роста клеток, а также на изучение особенностей цитокинового профиля слезной жидкости пациентов с односторонним СЛН на различных сроках – для выявления корреляций с этиологией и прогнозом лечения. Клиническая часть исследования включает в себя общую характеристику одной клинической группы, а именно 24

пациентов (24 глаза), исходя из пола, возраста, этиологии, типа, стадии и патологии, сопутствующей СЛН. Предложены критерии включения и исключения пациентов из исследования и методов оценки клинических исходов по критериям первичной эффективности (оценка эпителиального слоя роговицы объективным методом и окрашивание роговицы флюоресцеином с использованием компьютерной программы и ручного расчёта соотношения эпителий/конъюнктивы в процентах), оценку остроты зрения с помощью таблицы Сивцева-Головина. Вторичный критерий эффективности включал в себя систему бальной (от 0 до 3) оценки параметров роговицы (окрашивание, неоваскуляризация, конъюнктивализация и помутнение) с последующим вычислением общего балла от трех независимых друг от друга офтальмологов. В данной части главы также описываются используемые стандартные и дополнительные методы исследования пациентов.

**В третьей главе** соискатель подробно описывает полученные результаты экспериментального исследования: гистологические срезы роговиц с клетками, выросшими как на Боуеновой мембране, так и на строме, снимки клеток на сканирующей электронной микроскопии, иммуногистохимию образцов роговиц с выявлением маркеров, морфологию первичной культуры клеток из лимбальных трансплантатов, а также приводит результаты снимков фазово-контрастной микроскопии на 7-14-21 сутки культивирования. Описываются результаты иммуно-цитохимического исследования, анализа первичного пассажа мигрированных клеток из лимба, выявления экспрессии различных маркеров и выполнения проточной цитофлюориметрии культуры. Автор указывает на высокий пролиферативный потенциал клеток, преобладание лимбальных эпителиальных стволовых клеток лимба в популяции. Данные результаты, по мнению автора, являются экспериментальным обоснованием эффективности технологии аутологичной пересадки клеток и могут являться подспорьем для дальнейшей разработки клеточных технологий трансплантации. При анализе цитокинового профиля слезной жидкости у пациентов с односторонним СЛН автор находит положительную взаимосвязь между высоким соотношением провоспалительных цитокинов до операции и на сроках до 6 месяцев после операции с последующим преобладанием противовоспалительных цитокинов, а также выявляет связь этиологического фактора (ожог щелочью и кислотой) на наименее благоприятный прогноз лечения.

**В четвертой главе** автор описывает лабораторные исследования, а именно – особенности проведения методики импрессионной цитологии с пошаговым протоколом окраски полученных образцов и результатов иммуноцитохимического исследования. Особое внимание уделено использованию различных маркеров (кератинов) для эпителия и конъюнктивы. Описывается, что в ходе отработки технологии были использованы донорские роговицы, а в последствие техника была проведена на пациентах с подозрением на СЛН. В результате исследования автор выявляет наиболее значимые кератины, подтверждающие или опровергающие диагноз СЛН.

**В пятой главе** описываются клинико-функциональные результаты лечения 24 пациентов на сроках 6 и 12 месяцев, проанализированные по критериям эффективности. Подробно описываются новые методы хирургического лечения, а именно методы формирования туннелей в роговице (мануально или с использованием фемтосекундного лазера), проведение одномоментной передней послойной кератопластики с трансплантацией фрагментов лимба, использование предварительного выравнивания роговицы микробором. При этом автор указывает на особенности выполнения того или иного вмешательства, делая акцент на показаниях и преимуществах каждого метода. Данная глава также включает в себя раздел, посвященный алгоритму диагностики и хирургического лечения пациентов, в котором подробно разбирается каждый шаг врача на этапе первичного обращения и сбора анамнеза до проведения специализированной диагностики, исходя из которых строится окончательный диагноз с выбором хирургического лечения.

**Заключение** диссертационной работы посвящено обсуждению результатов, соискатель проводит сравнение полученных результатов с результатами, представленными в отечественной и зарубежной литературе. Проведя анализ проделанной работы, соискатель обосновывает, что полученные клинические и экспериментальные результаты послужили разработке неинвазивных методов диагностики, а также эффективных и безопасных методов аутооттрансплантации фрагментов лимба. Разработанная система диагностики и хирургического лечения пациентов с односторонним СЛН являются рекомендованными для внедрения в широкую клиническую практику.

#### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Представленный автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы и выводы.

#### **Вопросы и замечания**

Принципиальных замечаний по диссертационному исследованию Калинниковой С.Ю. нет.

В рамках дискуссии на защите целесообразно обсудить следующие вопросы:

1. Мог ли оставленный участок неизменного эпителия на этапе подготовки роговичной поверхности глаза реципиента стать источником лимбальных эпителиальных стволовых клеток в послеоперационном периоде?
2. Можно ли, используя предлагаемую Вами технологию обойтись без амниотического трансплантата и как, по Вашему, это повлияет на результат?

#### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Калинниковой Светланы Юрьевны «Экспериментально-клиническое обоснование новой технологии реконструкции эпителия роговицы у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности» является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-

методологическом уровне, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи – разработана и внедрена новая технология диагностики и лечения одностороннего синдрома лимбальной недостаточности, что имеет существенное значение как для офтальмологии, так и, на наш взгляд, для специальности «Трансплантология и искусственные органы».

По актуальности темы, научной новизне, объему проведенных исследований, научно-методическому уровню и научно-практической значимости полученных результатов и выводов диссертационная работа Калининковой Светланы Юрьевны полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в актуальной редакции с изменениями от от 18.03.2023 г.), предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а её автор достоин присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.5 – Офтальмология и 3.1.14 – Трансплантология и искусственные органы.

Начальник кафедры (клиники) офтальмологии  
Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова –  
главный офтальмолог Министерства обороны РФ  
доктор медицинских наук, профессор  
«30» августа 2023 г.



А.Н. Куликов

Подпись д.м.н. профессора Куликова А.Н. заверяю

Начальник отдела кадров  
Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова

«30» августа 2023 г.



П.В. Миличенко

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ  
Юридический и почтовый адрес: 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика  
Лебедева, дом 6;  
Телефон: +7 (812) 292-32-55  
Сайт в интернете: <https://www.vmeda.org>  
E-mail: [vmeda-na@mail.ru](mailto:vmeda-na@mail.ru)