

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

профессора РАН, доктора медицинских наук, заведующей Московским координационным центром органного донорства Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Городской клинической больницы им. им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы Мининой Марины Геннадьевны на кандидатскую диссертацию 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 специальностям 3.1.5 – Офтальмология и 3.1.14. – Трансплантология и искусственные органы.

Актуальность избранной темы

Диссертационная работа Калининковой С.Ю. посвящена глубокому клинико-экспериментальному изучению одной из наименее изученных патологий глазной поверхности - синдрому лимбальной недостаточности (СЛН). Патогенез данного патологического состояния связан с повреждением пула эпителиальных и мезенхимальных стволовых клеток лимба. Такое нарушение способности клеток к самообновлению может развиваться вследствие травмы, ожога, аутоиммунных, воспалительных и генетических заболеваний. Клиническая картина синдрома лимбальной недостаточности связана с возникновением стойкого эпителиального дефекта роговицы и впоследствии развитием хронической персистирующей эрозии, врастанием новообразованных сосудов и конъюнктивы на поверхность роговицы (формированием фиброваскулярного паннуса), а также формированием поверхностных и глубоких помутнений. Все вышеперечисленное приводит к значительному снижению остроты зрения, возникновению хронического болевого синдрома, светобоязни, слезотечения, риску присоединения

вторичной инфекции, что в свою очередь, значительно снижает уровень жизни пациента, маскируя лимбальную недостаточность с другими, схожими патологиями глазной поверхности.

На сегодняшний день все чаще встречаются пациенты с синдромом лимбальной недостаточности, которым уже неоднократно была выполнена оптическая кератопластика роговицы, хотя не безызвестным является тот факт, что наличие данного синдрома является основным фактором развития реакции отторжения трансплантата роговицы и относится к кератопластике «высокого риска». Ввиду длительного отсутствия эпителизации сквозного трансплантата, вновь происходит формирование фиброваскулярного pannуса и данное состояние ошибочно трактуется как болезнь трансплантата. Именно по этой причине соискатель уделяет особое внимание, необходимости тщательной диагностики и отбора пациентов на кератопластику, а также разработке патогенетический обоснованного лечения. На территории Российской Федерации хирургическое лечение одностороннего СЛН выполняется редко и связано с использованием довольно травматичных и не эффективных методик кератолимбальной или лимбально-конъюнктивальной ауто/аллотрансплантации, а существующие на сегодняшний день эффективные методики такие как: культивирование лимбальных стволовых клеток и простая аутологичная трансплантация (известная как SLET) являются недоступными в нашей стране. Таким образом, соискатель выделяет ряд проблем, связанных с отсутствием единого диагностического алгоритма, постановки правильного диагноза и выбора доступного и эффективного хирургического лечения.

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

Работа имеет классическую структуру. Методологически верно определены цель и задачи исследования. Диссертационная работа выполнена

на достаточном количестве экспериментального и клинического материала, с применением современных клинико-лабораторных методов исследования. Глубокий анализ данных с использованием методов математической статистики подтверждает достоверность исследования, обоснованность и аргументированность выносимых на защиту положений, выводов и практических рекомендаций. Полученные результаты имеют несомненное научное и практическое значение.

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», 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 имеет несомненную научную новизну. Впервые в мире предложены хирургические техники аутологичной пересадки стволовых клеток, не требующие использование фибринового клея; с применением фемтосекундного лазера; одномоментная пересадка послойного трансплантата и фрагментов лимба. Впервые предложенные технологии экспериментально обоснованы в эксперименте на моделях *ex vivo*. в диагностическом плане впервые в России был применен метод иммуцитохимического анализа мазков отпечатков с поверхности роговицы и выявлены специфические маркеры конъюнктивализации.

Все научные положения обоснованы достаточным количеством клинического материала (24 пациента, 24 глаза). Высокий методологический уровень обеспечивает достоверность научных положений и практических рекомендаций. Диссертационная работа выполнена с применением наиболее

современных клинико-лабораторных методов исследования. Выводы логически вытекают из результатов исследований, в полном объеме отражают поставленные задачи. Практические рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы проведенными исследованиями и могут служить руководством в работе специализированных офтальмологических отделений.

Автор самостоятельно осуществляла сбор материала для исследования, лично выполняла клинико-функциональные методы диагностики; диссертантом сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Научные положения и результаты диссертации имеют необходимую степень достоверности и аргументации.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, в ходе исследования разработаны различные модификации хирургического лечения лимбальной аутотрансплантации, объединены и описаны все возможные методы дополнительной инструментальной и лабораторной диагностики, разработана методика мазков-отпечатков с поверхности роговицы с последующим иммуноцитохимическим анализом, выявлены специфические белки (кератины) для точной верификации диагноза синдрома лимбальной недостаточности; проведена экспериментальная работа по *ex vivo* моделированию технологии G-SLET с оценкой роста клеток как на различных слоях роговицы, так и на разных видах культуральных сред; определена иммунологическая картина состояния цитокинового профиля слезной жидкости пациентов и выявлены взаимосвязь между этиологией и прогнозом лечения.

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, основанных на изучении отдаленных клинико-функциональных результатов лечения на большем количестве пациентов.

Установленные автором диагностические и лабораторные критерии, а также показатели и соотношения концентраций в слезной жидкости 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 нормального строения эпителия и лимба, особенностям дифференцировки стволовых клеток и регенерации эпителиального слоя роговицы. Описаны современные представления об этиологии и патогенезе синдрома лимбальной недостаточности. Особенности клинической картины, жалоб и существующие методы основной и дополнительной (вспомогательной) диагностики. Далее приводится подробный анализ современных методов хирургического лечения с описанием их недостатков и достоинств. В результате автор приходит к выводу, что для корректной диагностики синдрома лимбальной недостаточности необходима большая осведомленность врачей и настороженность, в особенности у пациентов с васкуляризованными бельмами роговицы. При этом соискатель заключает, что в связи с запретом на культивирование клеток и невозможность использования фибринового клея предложенная технология реконструкции эпителия G-SLET (в переводе с англ. бесклеевая простая лимбальная эпителиальная трансплантация) - является сопоставимой с таковыми по эффективности и разрешена к практическому использованию.

В связи с чем, автор ставит перед собой задачи- экспериментально обосновать технологию реконструкции эпителия и разработать новые методы хирургического лечения на основе ауто трансплантации лимба с применением фемтолазерных технологий.

Во второй главе автор описывает дизайн исследования, включающий в себя экспериментальную и клиническую части. Экспериментальное исследование основано на моделировании процессов ре-эпителизации на донорских роговицах, а именно выявлении возможностей и особенностей роста клеток на различных поверхностях роговицы, их фенотип и пролиферативный потенциал, в качестве группы контроля автор отдельно проводит культивирование лимбальных трансплантатов *ex vivo*, при этом

используются различные среды, преимущественно для роста эпителиальных и мезенхимальных стволовых клеток для определения фенотипа и влияния среды на рост. С помощью иммуноферментного анализа слезной жидкости пациентов с синдромом лимбальной недостаточности подробно описываются характерные изменения цитокинового профиля и проводится поиск положительных корреляций в зависимости от срока и этиологии заболевания до и после оперативного лечения. В клинической части автор описывает критерия включения и исключения исследуемой группы пациентов, которая составила 24 пациента (глаза), предлагает первичные и вторичные критерии эффективности для оценки проводимого лечения и описывает клинко-функциональные показатели пациентов и методы диагностических исследований в предоперационном периоде.

В третьей главе соискатель подробно описывает полученные экспериментальные и клинические результаты исследования. Также описываются результаты гистологических, иммуногисто- и цитохимических, методов исследования, данные сканирующей электронной микроскопии роговиц и иммуноферментного анализа слезной жидкости для определения возможности и характера роста клеток, вектора миграции, фено- и иммунофенотипа клеток, особенностей цитокинового профиля слезной жидкости. Автор указывает на равноценный рост клеток из трансплантатов по поверхности стромы и Боуменовой мембраны к в сторону центра роговицы так и периферию. Выявленный фено и иммунофенотип клеток на модельных роговицах и в контроле характеризует культуру как богатую лимбальными эпителиальными стволовыми клетками. Данный результат по мнению автора является экспериментальным медико-биологическим обоснованием эффективности проведения операций по технологии G-SLET в том числе совместно с передней послойной кератопластикой роговицы.

В четвертой главе соискатель излагает особенности выполнения забора клеток с поверхности роговицы по методике импрессионной цитологии. Указываются основные моменты техники прикладывания диска, условия

выполнения исследования, методика хранения. Предлагается пошаговый протокол окрашивания образцов методом иммуноцитохимического исследования. Автор представляет результаты цитологии 11 пациентов с подозрением на синдром лимбальной недостаточности, из которых у 9 пациентов по результатам цитологии диагноз был подтвержден наличием положительного высокоспецифического конъюнктивального кератина 7.

В пятой главе, посвященной клинико-функциональным результатам лечения пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности подробно описаны все методы хирургического лечения, основанные на применении как мануальных, так и фемтолазерных технологий, техника одномоментной трансплантации фрагментов лимба с передней послойной кератопластикой, определены показания к каждой предложенной методике лечения. В результатах показателей пациентов автор выявляет вероятность благоприятного исхода лечения равную 75% на сроке в год, а также приводит результаты данных экспертной оценки состояния роговицы в баллах. В заключении автор констатирует, что данная технология зарекомендовала себя как эффективная и способствующая стойкой ре-эпителизации роговицы и предлагает пошаговый алгоритм стандартной и специальной диагностики и хирургического лечения.

Заключение посвящено обсуждению результатов, где соискатель отмечает, что полученные результаты экспериментального исследования являются ранее не описанными в литературе, что говорит о новизне и актуальности дальнейшего изучения вопроса особенностей лечения синдрома лимбальной недостаточности. Отмечается, что иммуноцитохимический анализ отпечатков роговицы на выявление кератина 7 для верификации диагноза является наиболее значимым, что сопоставимо с уже ранее проведенными исследованиями зарубежных соавторов. По итогам клинического исследования автор заключает, что новый метод реконструкции эпителия по технологии G-SLET является экспериментально обоснованным и

эффективным и может быть рекомендован пациентам с односторонним синдромом лимбальной недостаточности.

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.

Заключение по работе

Диссертационная работа Калинниковой Светланы Юрьевны «Экспериментально-клиническое обоснование новой технологии реконструкции эпителия роговицы у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне.

По актуальности темы, научной новизне, объему проведенных исследований и значимости полученных результатов диссертационная работа Калинниковой Светланы Юрьевны полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

по специальностям 3.1.5 – Офтальмология и 3.1.14 – Трансплантология и искусственные органы может быть представлена к официальной защите.

Официальный оппонент:

профессор РАН, доктор
медицинских наук, заведующая
Московским координационным
центром органного донорства
ГБУЗ ГКБ им. С.П. Боткина
ДЗМ

«11» августа 2023 г.

Марина Геннадьевна Минина

Учёный секретарь

ГБУЗ ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ
доктор медицинских наук,
профессор

Давид Джонович Долидзе

Подпись д.м.н., профессора РАН Мининой М.Г. и д.м.н., профессора
Долидзе Д.Д. заверяю

/ Заместитель главного врача по кадрам
ГБУЗ ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ



Н.А. Брызгалова

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
Городская клиническая больница имени С.П. Боткина Департамента
здравоохранения города Москвы, 125284, Москва, ул. 2-й Боткинский проезд,
5. Телефон +7 (499) 490-03-03, E-mail: mscbotkin@gmail.com,
сайт в интернете: www.botkinmoscow.ru

Согласна на обработку персональных данных

М.Г. Минина