

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «НМИЦ ГБ
им. Гельмгольца» Минздрава России
академик РАН, профессор,
доктор мед. наук, заслуженный деятель
науки РФ, заслуженный врач РФ



В.В. Нероев

«24» августа 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Калининковой Светланы Юрьевны на тему «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, 3.1.14. Трансплантология и искусственные органы

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Калининковой С.Ю. направлена на решение одной из важнейших и малоизученных проблем в офтальмологии – диагностике и лечению одностороннего синдрома лимбальной недостаточности у пациентов с дефицитом лимбальных стволовых клеток. Известно, что этиологией данного заболевания являются ожоги, травмы глаз, инфекционные заболевания глазной поверхности, облучения, прием цитостатиков и т.д. В патогенезе синдрома лимбальной недостаточности особое внимание уделяется дисфункции или полному отсутствию прогениторных эпителиальных и мезенхимальных стволовых клеток лимба, осуществляющих цикл самообновления роговичного эпителия, который является естественным барьером между роговицей и конъюнктивой. В результате таких нарушений происходит нарастание

бокаловидных клеток конъюнктивы на поверхность роговицы с формированием фиброваскулярного паннуса, снижается адгезия эпителия к Боуеновой мембране, как вследствие образуются стойкие эпителиальные дефекты и хронические эрозии роговицы. Более того, процесс конъюнктивализации сопровождается вращением новообразованных сосудов, а также развитием локальных и диффузных помутнений стромы роговицы, значительно снижающих остроту зрения и качество жизни пациентов.

В настоящее время синдром лимбальной недостаточности на территории Российской Федерации малоизучен, эффективные технологии реконструкции эпителия не предложены, а единый алгоритм диагностики вовсе отсутствует. Тем не менее главной задачей остается установление правильного диагноза наличия синдрома лимбальной недостаточности у пациента, который как правило маскируется под другими, схожими заболеваниями глазной поверхности.

В отечественной литературе в лечении синдрома лимбальной недостаточности авторы описывают использование технологии конъюнктивально-лимбальной ауто/аллотрансплантации (CLAU/CLAL) или керато-лимбальной ауто/алло трансплантации (KLAU), а также биологическое покрытие роговицы с помощью человеческой криоконсервированной амниотической мембраны или аллопланта. Однако, доказана низкая эффективность описанных методов лечения, которые сопряжены с высоким риском развития ятрогенной лимбальной недостаточности на донорском глазу или оказывают системное негативное воздействие на организм в случае аллотрансплантации в виду длительного применения иммуносупрессивной терапии.

В последние годы зарубежными авторами активно изучаются вопросы диагностики и хирургического лечения направленного на реконструкцию эпителия. Однако, наиболее перспективные хирургические методики такие как: простая лимбальная эпителиальная трансплантация (SLET) подразумевает приклеивание фрагментов лимба на поверхность человеческой амниотической мембраны с использованием фибринового клея; также активно используется технология культивирования стволовых клеток лимба (CLET). Однако, не смотря на высокую эффективность методик использование фибринового клея и культивирование клеток запрещены на территории Российской Федерации.

В связи с вышесказанным, разработка экспериментально обоснованной технологии реконструкции эпителия при одностороннем синдроме лимбальной недостаточности является актуальным и своевременным исследованием.

Связь диссертационной работы с планом научных исследований

Диссертация Калинниковой С.Ю. на тему: «Экспериментально-клиническое обоснование новой технологии реконструкции эпителия роговицы у пациентов с

односторонним синдромом лимбальной недостаточности» выполнен в соответствии с планами научно-исследовательских работ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России. Работа соответствует специальностям 3.1.5. - Офтальмология, 3.1.14. - Трансплантология и искусственные органы.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Впервые в диссертационной работе выполнен эксперимент *ex vivo* и произведена оценка роста и определен 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 Боуменовой мембраны на кадаверных роговицах, выявило рост клеток вне зависимости от поверхности роговицы.

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.

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.

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.

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

Значимость полученных результатов для науки и практики

В диссертационной работе Калинниковой С. Ю. собраны фундаментальные и экспериментальные данные, подтверждающие способность стволовых клеток лимба со здорового глаза восстанавливать эпителий роговицы парного пораженного глаза. Фундаментальный характер исследования заключается в разработанной технологии реконструкции эпителия, позволяющей получать стабильные отдаленные клиничко-функциональные результаты и включает в себя несколько модификаций (использование абразивной обработки передней поверхности роговицы, применение низкоэнергетического фемтосекундного лазера на этапе формирования туннелей, одномоментное проведение послойной кератопластики с пересадкой стволовых клеток лимба), подходящих в том числе для пациентов с истонченными роговицами.

Для широкого практического применения автором разработан пошаговый алгоритм дооперационной диагностики и выбора тактики хирургического лечения пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности позволяющий верифицировать диагноз и осуществить выбор оптимального метода лечения данного заболевания.

Экспериментально в представленной работе было проведено моделирование процесса ре-эпителизации кадаверных роговицах, которое показало, что вне зависимости от поверхности (стромы или Боуменова мембрана), и культуральной среды для роста преимущественно мезенхимальных стволовых клеток (DMEM/F12) и роста эпителия (EpiLife) рост клеток от лимбальных трансплантатов наблюдается во всех случаях. Данные подтверждаются гистологическим, иммуногистохимическим исследованиям, а также сканирующей электронной микроскопией образцов, которые в полной мере экспериментально обосновывают эффективность применения данной технологии в клинике.

Достоверность выводов и положений, выносимых на защиту

Диссертационная работа Калинниковой С.Ю. выполнена с использованием современных объективных методов исследования, включающих иммуноферментный анализ, гистологический и иммуногистохимический анализы, лазерную сканирующую конфокальную и электронную микроскопии, оптическую когерентную томографию переднего отрезка глазного яблока, в том числе в режиме ангио.

Выводы основываются на достаточном объеме фактического материала, корректных методах статистической обработки данных. Таким образом, достоверность выводов не вызывает сомнений. Практические рекомендации сформулированы четко и

подкреплены результатами проведенного исследования. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертации.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы в практике

Проведенная Калининковой С.Ю. клинико-экспериментальная работа показала эффективность и безопасность применения технологии реконструкции эпителия у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности. 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. Создание протокола окрашивания в дальнейшем позволит использовать данную методику для верификации не только синдрома лимбальной недостаточности, но и множества других патологических состояний роговицы.

Пациентам с диагностированным синдромом лимбальной недостаточности, осложненным наличием симблефарона век, деформаций сводов, лагофталма, трихиаза необходимо первым этапом хирургического лечения проведение окулопластического вмешательства, после которого возможно проведение реконструкции эпителия по технологии G-SLET.

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.

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.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в ведении пациентов, а именно проведении до- и послеоперационной диагностики, ассистировании и непосредственном участии на операциях. 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. Соискателем самостоятельно был проведен забор слезной жидкости и мазков - отпечатков с роговицы, принято активное участие в экспериментальных исследованиях *ex vivo*, проведение окрашивания для иммуноцит- и гистохимического исследования, выполнение иммуноферментного анализа и проточной цитофлюориметрии. 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.

Апробация работы и публикации

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

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).

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Калининковой Светланы Юрьевны «Экспериментально-клиническое обоснование новой технологии реконструкции эпителия роговицы у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности», является завершенным научно-квалификационным трудом, выполненным на высоком научном и методологическом уровне. В работе представлено новое решение актуальной задачи офтальмологии: а именно, разработана и экспериментально обоснована технология реконструкции эпителия у пациентов с односторонним синдромом лимбальной недостаточности, являющихся перспективой для внедрения в широкую клиническую практику с целью лечения различных патологических состояний роговицы.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, полноте изложения и обоснованности выводов диссертационная работа Калининковой Светланы Юрьевны полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (с изменениями от 21.04.2016 №335), 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, а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени.

Отзыв о научно-практической значимости диссертации заслушан, обсужден и утвержден на заседании Экспертной комиссии Ученого совета ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

Протокол № 9 от «23» августа 2023 г.

Начальник отдела травматологии и
реконструктивной хирургии
ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца»
Минздрава России профессор, д.м.н.

Е.В. Ченцова

«Заверяю»

Врио ученого секретаря ФГБУ «НМИЦ ГБ
им. Гельмгольца» Минздрава России д.м.н.

О.В. Проскурина

Юридический и почтовый адрес:
ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России
105062, Москва, ул.Садовая-Черногрязская 14/19

тел. +7 (495) 625-87-73, (495) 434-42-12

Сайт в интернете: igb.ru, e-mail: kanc@igb.ru