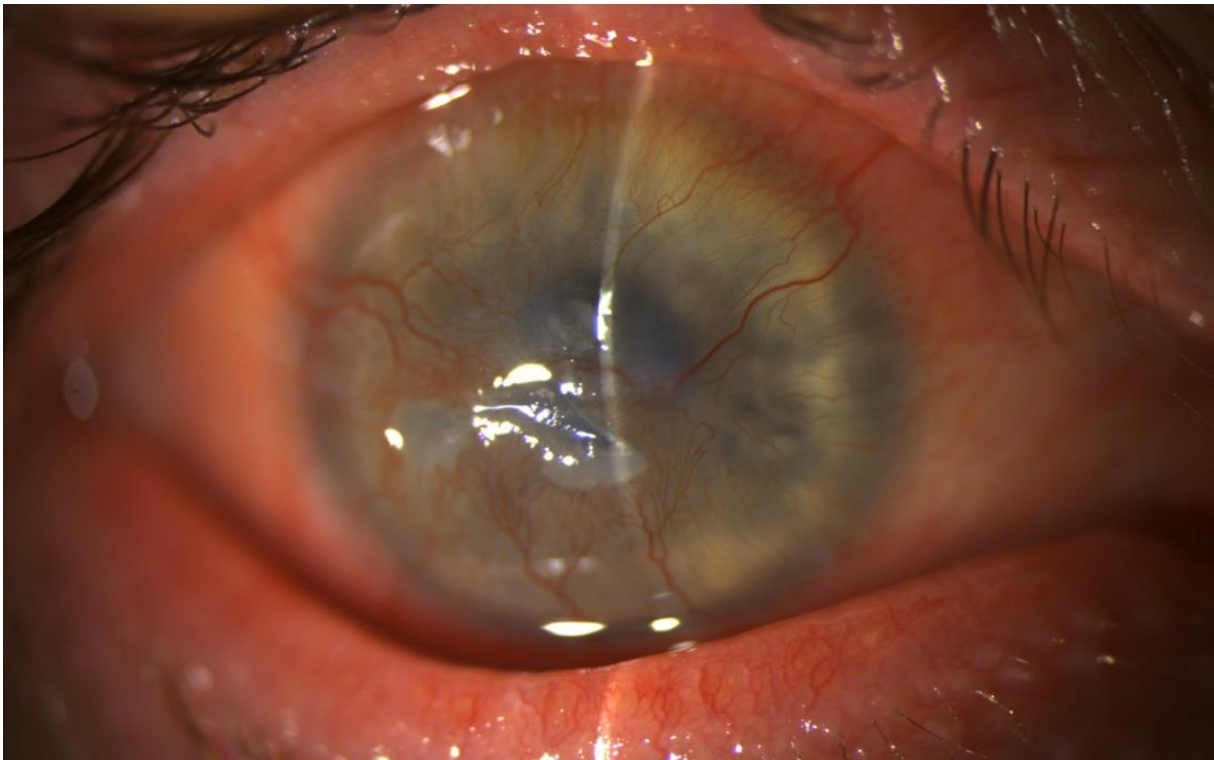


Представленная научная работа посвящена разработке и внедрению в клиническую практику новых методов диагностики и лечения синдрома лимбальной недостаточности (СЛН), который определяется как заболевание глазной поверхности, вызванное уменьшением популяции и/или функции эпителиального слоя роговицы/клеток-предшественников; что приводит к неспособности поддерживать нормальный гомеостаз эпителия роговицы (определение согласно Global Consensus on Definition Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency, S.X. Deng, 2019). Известно, что одной из самых частых причин возникновения СЛН являются ожоги глаз, их частота составляет от 6,1% до 38,4% от всех травм глаз (Пучковская Н.А., 2001, Черныш В.Ф, 2017).

Клинические проявления данной патологии связаны с возникновением персистирующих и рецидивирующих эпителиальных дефектов роговицы, врастанием новообразованных сосудов с формированием фиброваскулярного паннуса, и в тяжелых случаях, тотальным помутнением роговицы (рисунок 1) (Puangsricharern V., Tseng S.C. 1995, Sacchetti M., Lambiase A., Cortes M. 2005). В результате, в пораженном глазу происходит значительное снижение зрительных функций вплоть до правильной светопроекции, появляется светобоязнь, возникает хронический болевой синдром (Deng S., Sejpal K., Bakhtiari P. 2013).

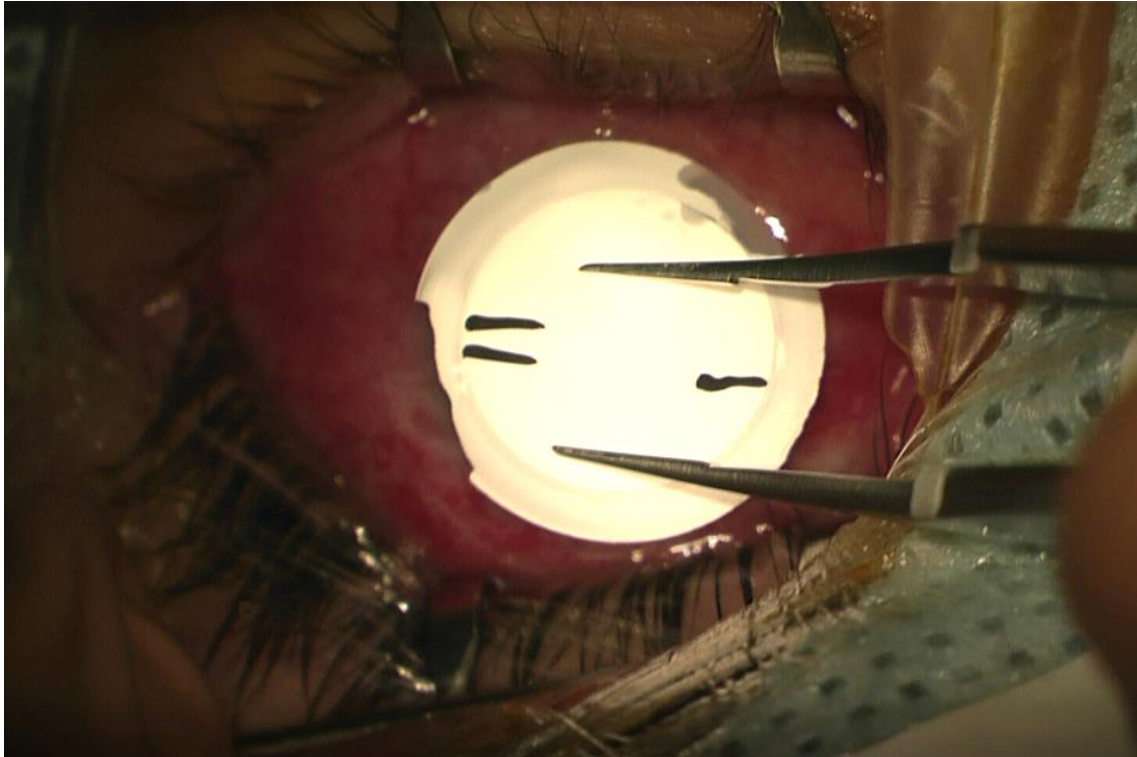
Зрительная реабилитация у пациентов с СЛН возможна только после восстановления функциональной активности лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК), обеспечивающих ре-эпителизацию роговицы. Наличие здорового эпителия является анатомическим барьером для новообразованных сосудов и конъюнктивального эпителия, а также обеспечивает защиту роговицы и всего микроокружения глазной поверхности.

Точная диагностика СЛН имеет решающее значение, поскольку соответствующее лечение может предотвратить прогрессирование заболевания и дальнейшее повреждение глазной поверхности. В данной работе мы представляем алгоритмы диагностики СЛН, используя новые современные методы исследования (биомикроскопия глазной поверхности с окрашиванием низкомолекулярным флюоресцеином, оптическая когерентная томография - ангиография переднего отрезка, лазерная сканирующая электронная микроскопия).



*Рисунок 1 – Биомикроскопическая картина роговицы пациента с односторонним полным СКН вследствие ожога. Визуализируется полное отсутствие палисад Вогта, нарастание конъюнктивального эпителия с сосудами по всей поверхности роговицы (полный СКН). В центральной части оптической зоне хроническая эрозия роговицы.*

Авторами впервые в Российской Федерации был введен в клиническую практику новый лабораторной метод диагностики СКН – иммуноцитохимический анализ мазков-отпечатков (импрессионная цитология, ИЦ), взятый с поверхности роговицы пораженного глаза. ИЦ - является прижизненным, повторяемым и достоверным методом диагностики с помощью которого были выявлены наиболее специфичные внутриклеточные маркеры характерные для эпителия конъюнктивы – кератин 7 (клон OV-TL 12/30) и роговицы – кератин 12 (рисунок 2). Их наличие на поверхности роговицы подтверждает или опровергает диагноз СКН.



*Рисунок 2 – Этапы получения мазка - отпечатка (ИЦ) с поверхности роговицы с использованием стерильного целлюлозного фильтра.*

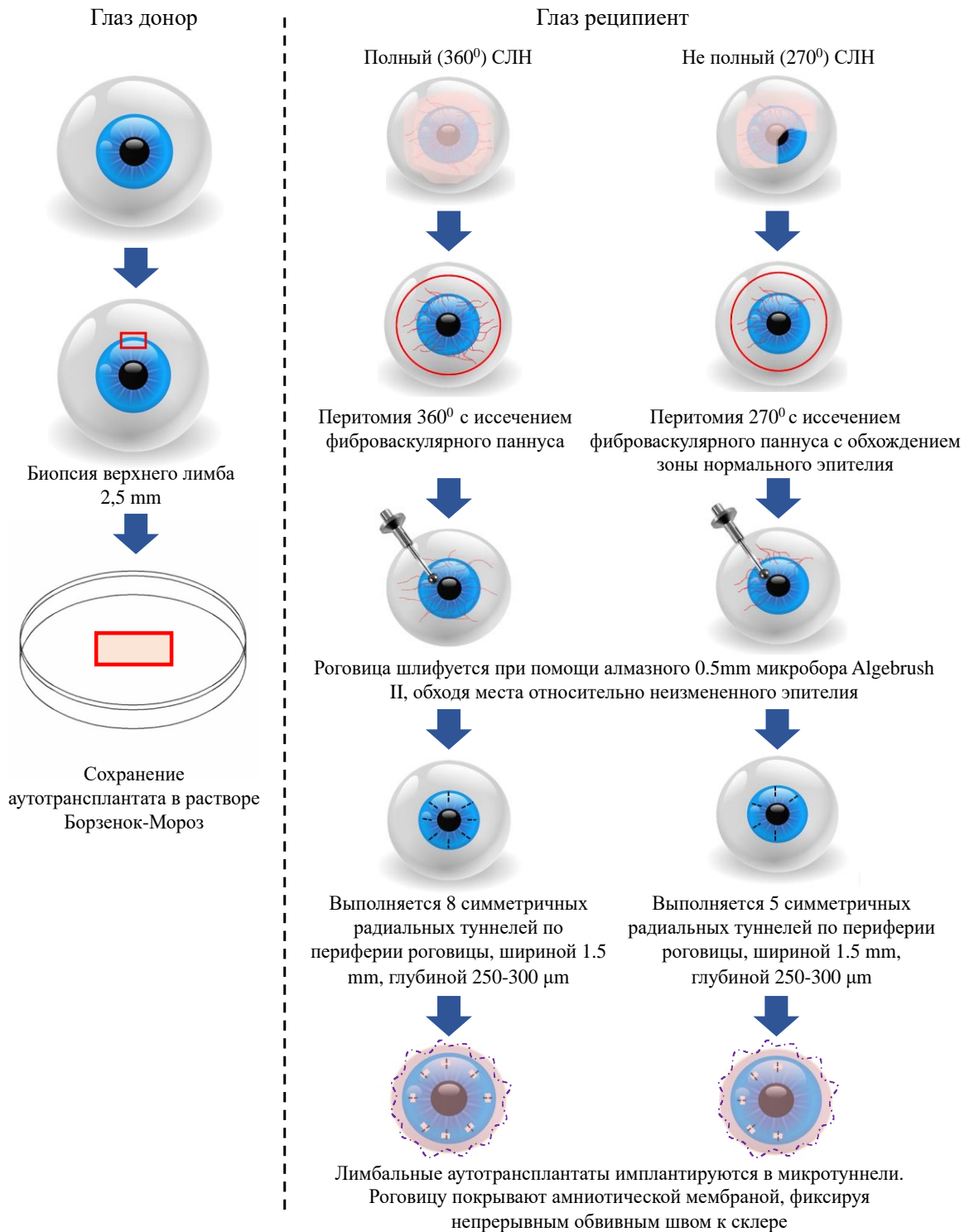
Хирургическое лечение одностороннего СЛН уже многие десятилетия сводится к трансплантации ЛЭСК (P. Prabhasawat, 2021). Среди хирургических техник на основе концепции ЛЭСК в 1989 г. была впервые предложена конъюнктивально-лимбальная ауто трансплантация от живого или посмертного донора (Holland E.J., 1996). Однако, ввиду обширной зоны иссечения лимба данная трансплантация была ассоциирована с высоким риском развития ятрогенной лимбальной недостаточности на донорском глазу. В 1994 году Tsai R.J.F. и Tseng S.C.G. предложили метод керато-лимбальной аллотрансплантации (Haagdorens M, 2016). Однако данная трансплантация требует длительной иммуносупрессивной терапии и часто обнаруживаются повреждения лимбального трансплантата в ходе операции (Espana E, 2004; Chan C, 2013). С учетом недостатков вышеуказанных техник была предложена технология аутологичной трансплантации культивированного лимбального эпителия. Она является одной из наиболее эффективных методик восстановления эпителиального слоя роговицы при одностороннем СЛН (Baylis O, 2011; Rama P, 2010; SangwanVS, 2011; Prabhasawat P, 2012). Однако, описанный метод культивации *in vitro* является весьма дорогостоящим и не

исключает явлений периферической васкуляризации с конъюнктивализацией после трансплантации [Nakamura T. Et al., 2016]. Более того пересадка культивированных клеток согласно Федеральному закону от 23 июня 2016 г. N 180-ФЗ "О биомедицинских клеточных продуктах" запрещена на территории РФ, что открывает перспективы в поиске альтернативных вариантов лечения. Были попытки проведения сквозной кератопластики (СКП) первым этапом и реконструкции эпителия роговицы вторым, однако выявлены низкие клинико-функциональные результаты, которые сопровождались помутнением трансплантата в ранние сроки и давали рецидивы конъюнктивализации поверхности роговицы (Basu S, 2016; Vazirani J, 2016). СКП, совмещённая с пересадкой культивированных ЛЭСК, как правило, не приводит к анатомическому успеху – эпителизации роговицы (Sangwan VS, 2011).

В 2012 году V. Sangwan с соавторами предложили технику простой лимбальной эпителиальной трансплантации (англ., simple limbal epithelial transplantation, SLET), суть которой заключается в иссечении 1,5-2,0 мм верхнего лимба на здоровом глазу, его разрезание на равные части и приклеивание на предварительно подклеенную фибриновым клеем амниотическую мембрану на глазу-реципиенте. В конце операции накладывается мягкая контактная линза (Sangwan VS, 2012). Данная техника является наименее травматичной, не требует использование донорского материала, что исключает реакцию тканевого отторжения. Эффективность операции по технологии SLET равна не менее 75%, при этом известны отдаленные высокие клинико-функциональные результаты (S. Basu, 2016) Несмотря на высокую эффективность, этапы операции SLET подразумевают использование фибринового клея, который в настоящее время не имеет свидетельства о регистрации в РФ («Tissucol kit» – «Baxter», Австрия) или зарегистрирован только в качестве гемостатического средства («Ivicel» – «Omrix», Израиль) и ранее никогда не изучался как носитель для лимбальных клеток. Это создает невозможность использования SLET в России, а альтернативных и эффективных способов лечения не предложено. Это обстоятельство определило актуальность данной работы.

Опираясь на современные представления о данном заболевании основной идеей исследования стало разработать единую систему диагностики и хирургического лечения одностороннего СЛН на основе ауто трансплантации

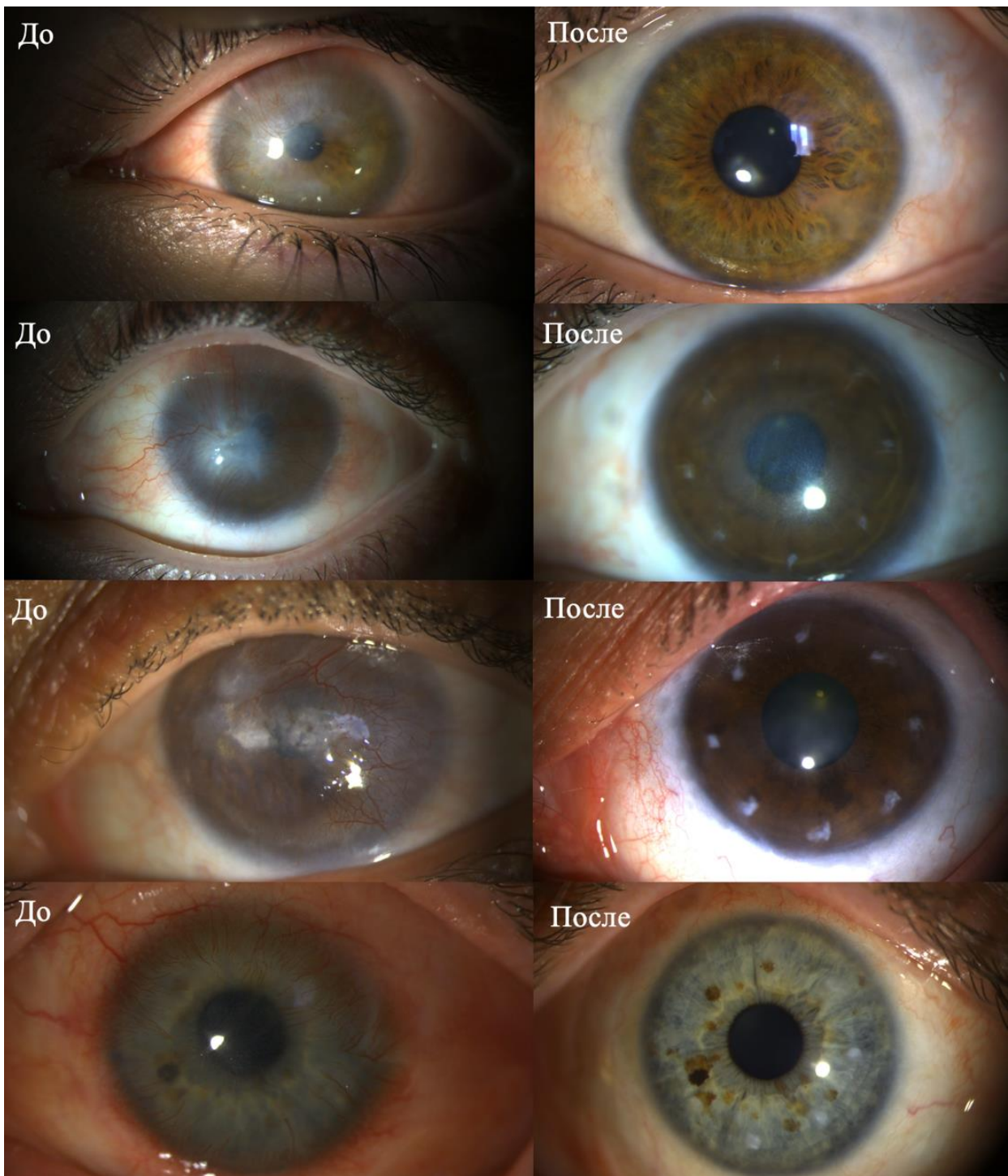
стволовых клеток лимба. Впервые в мире в 2018 г. была предложена технология бесклеевой простой лимбальной эпителиальной трансплантации (англ, glueless simple limbal epithelial transplantation, G-SLET), которая исключает использование клея. Суть операции заключается в иссечении фиброваскулярной ткани на роговице пораженного (реципиентного) глаза, иссечение лимбального ауто трансплантата на здоровом глазу (глаз-донор) его фрагментации на 8 частей и помещении полученных мини-трансплантатов в туннели, расположенные по периферии роговицы пораженного глаза (без использования фибринового клея), далее накладывается криоконсервированная человеческая амниотическая мембрана. В ходе совершенствования технологии G-SLET были предложены варианты выравнивания роговицы перед трансплантацией стволовых клеток; использование низкоэнергетического фемтосекундного лазера на этапе формирования туннелей и забора лимбальных стволовых клеток со здорового глаза; одномоментное проведение послойной кератопластики с ауто трансплантацией фрагментов лимба у пациентов с истонченной роговицей (рисунок 3).



*Рисунок 3 – Схема выполнения бесклеевой лимбальной эпителиальной трансплантации с предварительным выравниванием глазной поверхности и биологическим покрытием роговицы при полном и неполном СЛН в мануальной технике.*

До начала клинического применения нового метода нами проведена всесторонняя экспериментальная его оценка. Главной целью эксперимента стало выяснить возможности роста ЛЭСК на различных поверхностях роговицы и при разных условиях. Основной задачей предложенного эксперимента стало: моделирование ре-эпителизации максимально приближенное к реальным условиям с детальным изучением роста, фено- и иммуно-фенотипа клеток культивированных от лимбальных микро-трансплантатов. Для чистоты эксперимента в предложенной работе использовалась группа контроля и разные культуральные среды EpiLife (0,06 mM Ca<sup>++</sup>)/ DMEM/F12 (1:1) (1,05 mM Ca<sup>++</sup>). По итогам проведенного исследования на основании иммуногистохимического анализа, гистологического исследования и по данным сканирующей электронной микроскопии на всех образцах кадаверных роговиц (с помещенными в туннели микро-трансплантатами лимба) и в группе контроля (лимбальные трансплантаты культивированные в чашке Петри), был выявлен высокий потенциал пролиферации клеток (p63, Ki67), высокий уровень стволовости (CD 73, 90, 105) и экспрессии маркера эпителиальных клеток (CD 29). Культура клеток, полученная из эксплантов лимба роговицы, характеризуется как популяция содержащая в своём абсолютном большинстве ЛЭСК, необходимые для полноценной эпителизации роговицы при СЛН. Таким образом, была доказана высокая эффективность и безопасность технологии G-SLET, а также обоснована возможность применения в широкой клинической практике.

На сегодняшний день по технологии G-SLET было прооперированно 49 пациентов с положительным исходом более 75%. Первая операция была выполнена в 2018 году, затем до 2020 года было выполнено еще 8 аутологичных трансплантаций лимбальных стволовых клеток (при этом положительный исход был выявлен лишь у 5 пациентов). Однако активное усовершенствование технологии, а также грамотная предоперационная диагностика позволили за период с 2021 по 2022 год провести еще 25 трансплантаций (с положительным исходом операции у 22 пациентов). За 2023 г. выполнено 15 операций по данной технологии, успех которых (ре-эпителизация роговицы) составил 100%. Пациентам с рецидивом конъюнктивализации (неудача - 7 пациентов) была выполнена повторная трансплантация ЛЭСК по технологии G-SLET с успехом ре-эпителизации 100% (рисунок 4).



*Рисунок 4 – Биомикроскопия глазной поверхности у пациентов до и после (через 12 месяцев) после трансплантации фрагментов лимба по технологии G-SLET.*

Из всех 49 пациентов 13 пациентам в период с 2022 по 2023 г. вторым этапом (из-за недостаточности прозрачности роговицы) была выполнена сквозная кератопластика роговицы с положительным исходом (прозрачное приживление) в 100% случаев. На сегодняшний день 7 пациентов ожидают второй этап лечения (СКП



на 2024–2025 гг.), в очереди на операцию G-SLET поставлено 37 пациентов, среди них 25 человек трудоспособного возраста, 5 пациентов - дети дошкольного возраста.

Таким образом, разработанная технология аутологичной бесклеевой лимбальной эпителиальной трансплантации (G-SLET) с предложенными модификациями является эффективной и способствует успешной ре-эпителизации роговицы, так как процент эпителизации роговицы у пациентов с односторонним СЛН через год составляет более 75%, что на наш взгляд является высоким показателем. По этой причине нашей главной задачей является активное внедрение данной технологии по всей России. Несмотря на наше активное участие и многочисленные выступления на Всероссийских научно-практических конференциях и наличие целого ряда публикаций на данную тему, следует признать неполную информированность практикующих врачей офтальмологов относительно достигнутых нами успехов в лечении СЛН.

Широкое внедрение этих уникальной технологии в клиническую практику позволят: врачам снизить процент неудачи сквозных кератопластик роговицы (из-за недиагностированного СЛН), а пациентам вернуть утраченное зрение. Благоприятный исход трансплантации ЛСК будет способствовать восстановлению работоспособности у людей молодого возраста; обеспечит снижение инвалидности и социальную адаптацию у лиц разного возраста, в особенности у детей так как особенно у них возможен риск неполного развития зрительного анализатора. Уникальная технология позволит привлечь пациентов из других стран (медицинский туризм), имеется потенциал коммерциализации разработанного авторами набора инструментов для операции и разработанного оригинальное программное обеспечение для фемтосекундного лазера, обеспечивающего выполнение операций по технологии G-SLET. Проведение мастер-классов и курсов дополнительного профессионального образования (в том числе на on-line платформах) обеспечит широкое внедрение технологий в среде врачей, занимающихся лечением заболеваний переднего отрезка глазного яблока, травмами и ожогами.