ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Дениско Марьяна Сергеевна

**ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ХИРУРГИИ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСТРОФИИ РОГОВИЦЫ**

31.06.01 – Клиническая медицина

Профиль: Глазные болезни

Научно-квалификационная работа

Научные руководители:

доктор медицинских наук,

профессор О.И. Кривошеина

Томск – 2024

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) роговицы – хроническое, неуклонно прогрессирующее заболевание роговой оболочки с развитием ее хронического отека, значительным снижением остроты зрения и нередко выраженным болевым синдромом. Согласно данным научной литературы, ЭЭД роговицы занимает одну из лидирующих позиций среди корнеальной слепоты в Российской Федерации (Мамиконян В.Р., Труфанов С.В. 2010, Джураева Ш.У., Гельманова Т.И., 2010, Каспарова Е.А., Суббот А.М., Антохин А.И., 2011, Малюгин Б.Э., Мороз З.И., Дроздов И.В., 2013). Согласно данным отечественных ученых (Комах Ю.А., Борзенко С.А., Мороз З.И., 2005), 1/3 всех операций кератопластики проводится по поводу ЭЭД роговицы различной этиологии.

Лечение ЭЭД роговицы в настоящее время проводится в двух направлениях – консервативном и хирургическом. Консервативное лечение, включающее применение различных кератопластических, гиперосмотических, слезозамещающих и антиоксидантных средств, а также лечебные мягкие контактные линзы и гелий-неоновое лазерное излучение (Ушаков Н.А., Муравьева Э.В., Фокина Д.В., 2010, Сосин И.Н., Буявых А.Г., 1998, Вахова Е.С., Яни Е.В., Селиверстова К.Е., 2018) обеспечивает лишь временный клиничко-функциональный эффект.

Патогенетически обоснованным и радикальным методом лечения ЭЭД роговицы является сквозная кератопластика и ее модификации.

Однако, высокий риск развития послеоперационных осложнений (присоединение вторичной инфекции, помутнение или отторжение трансплантата), длительный период реабилитации и вероятность рецидива заболевания ограничивают широкое применение кератопластики и ее модификаций при лечении ЭЭД роговицы (Cormier G., Brunette I., Boisjoly N.M., 1996, Мороз З.И., Тахчиди Х.П., Калинин Ю.Ю., 2004, Гундорова

Р.А. и др. 2007, Каспаров А.А., Каспарова Е.А., Труфанов С.В. и др. 2010, Рикс И.А., Папанян С.С., Астахов С.Ю., Новиков С. А., 2017).

Развитие биомедицины – направления, сочетающего в себе знания клинической науки, тканевой инженерии, регенеративной медицины, определило новый вектор изучения закономерностей течения заболеваний на фоне применения клеточных технологий. Одним из перспективных направлений биомедицины является клеточная терапия, целью которой является улучшение и/или восстановление функций поврежденного органа на основе применения клеток различных популяций, преимущественно, аутологичного происхождения.

В связи с вышеизложенным, применение клеточных технологий в лечении ЭЭД роговицы может быть своеобразной альтернативой существующим направлениям лечения данного заболевания.

Степень разработанности темы исследования

Основоположителем применения клеточной терапии при лечении патологии роговой оболочки различной этиологии в России является профессор А.А. Каспаров, предложивший метод локальной экспресс-аутоцитокинотерапии (ЛЭАЦКТ) на основе соединения аутологичной крови больного и комплекса полиадениловой и полиуредиловой кислот (Полудан) (Каспаров А.А., 2010). На фоне применения данного метода клеточной терапии при лечении ЭЭД роговицы значительно уменьшается отек всех слоев роговой оболочки с нормализацией ее толщины и постепенным улучшением зрительных функций больного глаза. Однако, в связи с необходимостью предварительного инкубирования комплекса клеток крови больного и раствора Полудана со строгим соблюдением условий культивирования (стерильность, температура, влажность и т.д.), опасностью развития внутриглазной инфекции методика не получила должного распространения в клинической практике.

N. Okumura [2001] предложил в качестве лечения ЭЭД роговицы интракамеральное введение суспензии эндотелиальных клеток роговицы,

культивированных предварительно в питательной среде с ингибитором Rho-ассоциированных киназ для повышения адгезионной способности эндотелицитов. Однако, данная клеточная технология лечения ЭЭД роговицы не получила широкого распространения вследствие сложности как получения донорских эндотелиоцитов роговой оболочки, так и подготовительного периода культивирования эндотелиальных клеток.

Для стимуляции репаративной регенерации при ЭЭД роговицы перспективным вариантом является применение популяции аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови, обладающих высокой пластичностью и способностью легко адаптироваться к любому микроокружению и меняющимся условиям среды, что может иметь хороший потенциал для репаративной регенерации дистрофически измененной роговой оболочки.

Цель исследования - изучить закономерности течения индуцированной ЭЭД роговицы на фоне введения суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов в толщу стромы пораженной оболочки в эксперименте *in vivo* и на их основе обосновать эффективность применения нового хирургического с использованием персонализированного клеточного подхода метода лечения заболевания.

Задачи исследования:

1. В эксперименте *in vivo* выявить и изучить влияние введения суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов в толщу стромы роговой оболочки больного глаза на динамику течения индуцированной ЭЭД роговицы.

2. Выявить и детально изучить в эксперименте *in vivo* морфологические особенности воспалительно-регенераторных процессов при индуцированной ЭЭД роговицы на фоне локальной отслойки десцеметовой мембраны и введения суспензии аутологичных моноклеаров крови в толщу стромы роговой оболочки больного глаза.

3. Изучить клиническую и функциональную эффективность нового хирургического на основе персонализированного клеточного подхода метода

лечения ЭЭД роговицы, включающего локальную отслойку десцеметовой мембраны и введение суспензии аутологичных мононуклеаров крови в толщу стромы роговой оболочки больного глаза.

4. Провести анализ содержания про- и противовоспалительных цитокинов в слезной жидкости больного глаза у пациентов с ЭЭД роговицы до лечения и после интрастромального введения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов.

5. Проанализировать характер и частоту развития интра- и послеоперационных осложнений лечения ЭЭД роговицы с помощью нового на основе персонализированного клеточного подхода метода оперативного вмешательства в сравнении с фармакотерапией заболевания.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты экспериментальных исследований *in vivo* расширяют имеющиеся представления о патогенезе ЭЭД роговицы. Выявлено, что биомикроскопическая картина роговой оболочки с увеличением толщины ее оптического среза сопоставимы со спонтанным течением заболевания в клинической практике.

Экспериментальные исследования позволили изучить динамику патоморфологических изменений в ткани роговой оболочки по мере развития и прогрессирования индуцированной *in vivo* ЭЭД роговицы.

Исследования *in vivo* показали, что введение суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови в толщу стромы роговой оболочки при лечении ЭЭД стимулирует репаративную регенерацию ткани роговицы, ускоряя резорбцию отека и способствуя восстановлению прозрачности оболочки.

Разработан и внедрен в клиническую практику в офтальмологических клиниках ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (г. Томск), ООО «Гранд Ретина» (г. Томск) и ООО «Микрохирургия глаза» (г. Томск) новый хирургический с использованием персонализированного клеточного подхода

метод лечения ЭЭД роговицы, обеспечивающий высокие и стабильные клиничко-функциональные результаты в послеоперационном периоде.

Получены патенты Российской Федерации на изобретение «Способ хирургического лечения эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы» № RU 2674237 C1 от 31.07.2017 г., № RU 2780273 C1 от 18.02.2022 г.

Методология и методы исследования

Для реализации поставленных задач использованы современные высокоинформативные методы исследования, включающие:

1. Моделирование ЭЭД роговицы *in vivo* (на кроликах породы Шиншилла).
2. Микроскопические методы исследования – световая микроскопия окрашенных гематоксилином и эозином препаратов роговицы экспериментального животного.
3. Клинические методы исследования – сбор жалоб и анамнеза заболевания.
4. Инструментальные и лабораторные методы исследования – визометрия, периметрия, пневмотонометрия, биомикроскопия переднего отрезка глазного яблока, бинокулярная офтальмоскопия, пахиметрия роговицы больного глаза, фоторегистрация переднего отрезка больного глаза, ультразвуковое В-сканирование, спектральная оптическая когерентная томография роговицы больного глаза, иммуноферментный анализ слезной жидкости больного глаза.
5. Статистический анализ результатов с использованием программного обеспечения SPSS и IBM SPSS Statistics 20.

Выводы

1. Экспериментальное моделирование *in vivo* ЭЭД роговицы у лабораторных животных (кролики порода Шиншилла) путем повреждения и удаления эндотелиального слоя роговой оболочки в 100% случаев обеспечивает воспроизведение заболевания с развитием роговичного синдрома и гидропической дегенерации ткани роговицы больного глаза через 2 недели после воспроизведения модели болезни.

2. Введение суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови в заднюю треть стромы роговицы больного глаза при лечении индуцированной ЭЭД роговой оболочки в эксперименте *in vivo* способствует более быстрому (в 3,9 раза) уменьшению гидратации стромы со значительным (в 11,0 раз) сокращением числа дистрофически измененных клеток переднего эпителия роговицы больного глаза и ускоренным (в 1,3 раза) восстановлением толщины среза роговой оболочки и ее прозрачности по сравнению с курсом фармакотерапии.

3. Течение ЭЭД роговицы сопровождается развитием дисбаланса в системе цитокинов слезной жидкости больного глаза с повышением содержания провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α в 2,0-4,2 раза, а противовоспалительных цитокинов IL-4, IL -10, TGF- β 2 только в 1,1 раза по сравнению с нормальными значениями.

4. Применение нового хирургического метода лечения ЭЭД роговицы с введением суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови в глубокие слои стромы роговой оболочки обеспечивает быстрое уменьшение отека роговичной ткани (на 17,1-20,6%) со стабильным восстановлением ее толщины, улучшением прозрачности и значительным (в 6,7-10,0 раз) повышением остроты зрения больного глаза по сравнению с курсом фармакотерапии.

5. Применение нового хирургического на основе персонализированной клеточной технологии метода лечения ЭЭД роговицы способствует уменьшению выраженности цитокинового дисбаланса слезной жидкости больного глаза, обеспечивая существенное (в 1,7-2,0 раза) снижение уровня провоспалительных цитокинов на фоне постепенного повышения (в 1,7-2,3 раза) содержания противовоспалительных цитокинов.

6. Введение суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови в глубокие слои стромы роговой оболочки при лечении ЭЭД роговицы не сопровождается развитием интра- или послеоперационных осложнений и характеризуется отсутствием побочных эффектов.