

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ  
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО  
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. М. ГОРЬКОГО»

*На правах рукописи*

**КАВЕЛИНА АННА СТАНИСЛАВОВНА**

УДК 617.713:611.018.7:612.841.1:615.361+57.021:57.082.26:57.086.13

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЗДАНИЯ  
БИОЭКВИВАЛЕНТА ПОВЕРХНОСТНЫХ СЛОЕВ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА  
ЧЕЛОВЕКА**

14.03.03- патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Донецк–2022

Работа выполнена в Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» (ГОО ВПО ДОННМУ им. М. ГОРЬКОГО), г. Донецк.

Научный руководитель: **доктор медицинских наук, доцент Кравченко Александр Иванович**

Официальные оппоненты: **Милюдин Евгений Сергеевич,**  
доктор медицинских наук, доцент Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» (ФГБОУ ВО) Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Фабер Анна Ивановна,**  
кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии им. проф. Н. Н. Транквилитати Государственная образовательная организация высшего профессионального образования Донецкий Национальный Медицинский Университет имени М. Горького (ГОО ВПО ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО)

Ведущая организация: Республиканский травматологический центр Министерства Здравоохранения Донецкой Народной Республики

Защита состоится «22» февраля 2023 года в 12:00 на заседании Диссертационного совета Д 01.022.05 при ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО по адресу: 283003, г. Донецк, пр-т Ильича, 16. Тел.: (062) 344-41-51, факс: (062) 344-41-51, e-mail: [spec-sovet-01-022-05@dnmu.ru](mailto:spec-sovet-01-022-05@dnmu.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОО ВПО ДОННМУ им. М. ГОРЬКОГО по адресу: 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16.

Автореферат разослан « » января 2023 года

Ученый секретарь  
Диссертационного совета Д 01.022.05  
д. мед. н., доцент

А. И. Кравченко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** По данным Всемирной организации здравоохранения заболевания роговицы составляют 1/4 от всех болезней глаз и являются причиной от 3 до 5 % слепоты во всем мире, что является достаточной важной и актуальной проблемой офтальмохирургии (Кузьмичев К.Н, 2022г., Ченцова Е.В., 2018г., Dallal MMS., 2021г., El-Hofi A., 2019г., Röck T., 2018г.).

За последние время в Российской Федерации выявлено более 450 тысяч слабовидящих и слепых, из них пациенты с патологией роговицы составляют 18% (Осилян Г.А., 2021.г, Труфанов С.В., 2019г., Назарян М.Г., 2021г.).

Лимбальные стволовые клетки (ЛСК) представляют популяцию низкодифференцированных клеток эпителия лимбальной зоны, препятствуют инвазии конъюнктивального эпителия на поверхность роговицы (Nili E., 2019г.). ЛСК обладают основной характеристикой стволовых клеток, способностью к дифференцировке и пролиферации под влиянием расположенной рядом среды с соответствующими лимбальными сосудами - так называемой ниши (Ruan Y., 2021г.). Нишами для ЛСК служат палисады Фогта (Li G., 2018г.). Для поддержания нормального функционирования ЛСК необходим определенный баланс экстрацеллюлярного матрикса, растворимых биохимических медиаторов и вспомогательных клеток внутри ниши (Polisetty N., 2022г.). Повреждение структуры ниши происходит при различных заболеваниях, а именно, термические и химические ожоги (Черныш В.Ф., 2017г.), герпетические кератиты (Зайнутдинова Г.Х., 2019г., Бржеская И.В., 2018г., Чернакова Г.М., 2019г.), трофические нарушения роговицы (Труфанов С.В., 2021г.), вторичная отечная дистрофия роговой оболочки (Рожко Ю.И., 2020г., Ивачев Е.А., 2018г.) заболевания, связанные с иммунной системой- синдром Стивена-Джонса, пемфигоид (Deng S., 2020г.) приводят к помутнению и истощению ЛСК, а впоследствии к аплазии. В результате развивается лимбальная недостаточность (ЛН). При ЛН нарушается баланс между образованием новых клеток и их гибелью, с нарастанием на роговицу эпителия конъюнктивы, с возникновением стромального воспаления, приводящего к помутнению роговицы, а в последующем, и к потере зрения (Holland E.L., 2013г.).

Несвоевременное применение хирургических методов лечения может являться причиной осложненного лечения и неблагоприятного исхода воспалительного процесса (Ченцова Е.В., 2016г.). По данным разных источников существует риск осложнений, приводящих к потере зрения и гибели глаза, что составляет 35-65% всех случаев (Терещенко А.В., 2019г., Kasparova E.A., 2016г.).

Клеточная терапия - одно из новых научных направлений регенеративной медицины, интенсивно развивающее в последние десятилетия, основными требованиями которой являются безопасное использование алло- и аутологичных живых клеток. Ведутся исследования по разработке новых биоконструкций искусственной роговицы на основе биополимеров и

натуральных материалов. Совокупность механических свойств, биосовместимость и ряд других требований к тканевым матрицам необходимы при разработке технологии искусственной роговицы (Малюгин Б.Э., 2013г.).

В настоящее время широкое применение в реконструкции последствий повреждений глаза получила амниотическая мембрана (АМ) (Бочкарева А.Н., 2019г.). Амнион является самым внутренним слоем зародышевых оболочек человека. Содержащие в составе АМ цитокины и факторы роста обуславливают её уникальные биологические свойства. АМ, обладая низкой иммуногенностью, препятствует послеоперационной инфекции, а также может служить субстратом для культивирования стволовых клеток и эпителиальных клеток глаза.

Криобиология вносит существенный вклад в изучение влияния низких и сверхнизких температур на живые объекты. Согласно данным литературы изучено влияние процесса криоконсервации на функциональную целостность стволовых клеток и их успешное применение в клинической медицине (Whaley D., 2021г.). Криоконсервация является единственным известным методом, способным обеспечить длительную сохранность жизнеспособных клеток, а также матриц (Li R., 2019г.).

Выявление особенностей в плане обоснования основных патогенетически-обоснованных методик создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы может стать почвой для разработки нового научного оптимального метода, позволяющего ускорять процессы регенерации роговицы глаза человека. Возможность использовать криоконсервированную АМ как подложку для культивирования поверхностных слоев роговицы глаза человека с последующей криоконсервацией, с сохранением жизнеспособности клеток позволит применять её при многочисленных патологических процессах роговицы глаза, что во многом предопределит исход осложнений.

**Степень разработанности проблемы.** Основанием для выполнения работы служат исследования отечественных и зарубежных ученых, посвящённые особенностям патофизиологических изменений в роговице при истощении популяции стволовых клеток лимба роговицы, возникающих при синдроме лимбальной клеточной недостаточности. Многими исследователями ведется поиск биологических и синтетических матриц по заданным параметрам (Куликов А.Н., 2018г.). Учитывается прозрачность, прочность, нетоксичность, биосовместимость, а также наличие низкого уровня показателя сжатия при исследовании культивированных клеток на поверхности субстрата. Потенциальные носители для культивированных эпителиальных стволовых клеток роговицы глаза человека должны быть удобны в применении и иметь невысокую стоимость производства. Рассматривают такие варианты как: фибрин, коллаген, кератин, хитозан с желатином, фибронектин, шелка, поликаполактон, полилактид-ко-гликолид (Feng Y., 2014г.). Однако получено недостаточное количество результатов *in vitro*, вследствие чего возникает

необходимость продолжения экспериментальных и соответствующих клинических исследований.

Культивированные ЛСК широко применяются во всех офтальмологических клиниках по всему мира (Singh A., 2021г.). Трансплантация АМ внесла существенный вклад в лечение состояний, вызванных дефицитом СК лимба, приводящим к потере зрения. Амнион обладает свойствами, способствующими росту эпителиализации, контролируют процесс воспаления и рубцевания и одновременно является своеобразной нишой для культивированных клеток, сохраняя их морфологические и фенотипические свойства.

В последнее десятилетие усилия офтальмологии направлено на поиск новых субстратов, адгезивных для клеточных элементов при длительном культивировании в монослое неменяющих свой фенотип, неспособных терять функциональные характеристики.

Противоречивое мнение по поводу фиксирования амниона на поверхности роговицы, а также возможность послойного культивирования нескольких клеточных культур роговицы глаза человека на поверхности базальной и стромальной сторонах АМ, наличие постоянного резерва криоконсервированного клеточно-тканевого эквивалента, послужили для автора мотивом и целью для проведения данного исследования.

Всё вышеизложенное побудило приступить к изучению патогенетических особенностей создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека и обоснованию проведенного сравнительного исследования с целью последующего применения в лечении тяжёлой патологии роговицы глаза.

**Цель исследования** – определить возможность создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека путем патогенетического обоснования выбора методики поэтапного послойного культивирования ЛСК и КПЭ роговицы на базальной и стромальной сторонах АМ.

### **Задачи исследования**

1. Выявить особенности получения первичных культур ЛСК и КПЭ роговицы человека. Охарактеризовать профиль экспрессии стволовых и эпителиальных маркеров в выделенных клетках, определить пролиферативные свойства.
2. На основании выявленных особенностей обосновать целесообразность метода культивирования на поверхности амниотической мембраны с учетом сохранения биологически активных свойств субстрата.
3. Провести сравнительный анализ методик культивирования клеточных линий на стороне базальной мембраны и стромальной стороне амниотической мембраны.

4. С патофизиологических позиций обосновать морфофункциональное состояние культивированных ЛСК и КПЭ в многослойном культивировании на поверхности субстрата.

5. С учетом патогенетического обоснования определить возможность криоконсервации культивированных ЛСК и КПЭ в составе оптимальной питательной среды на поверхности АМ.

*Объект исследования:* биоинженерная конструкция поверхностных слоев роговицы глаза.

*Предмет исследования:* методика создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека с использованием клеточных линий роговицы глаза человека на поверхности амниотической мембраны.

### **Научная новизна**

1. Впервые разработана и предложена методика получения первичных клеточных культур ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека.
2. Экспериментально установлена принадлежность культивированных лимбальных клеток роговицы глаза человека в монокультуре и в составе многослойного культивирования к компартменту СК лимба.
3. Проведен сравнительный анализ морфологических особенностей, пролиферативной активности, эффективности колонеобразования в условиях культивирования.
4. Изучена возможность с учетом патогенетических особенностей криоконсервации послойного культивирования ЛСК и КПЭ роговицы человека на обеих сторонах амниотической мембраны.
5. Впервые проведены иммуногистохимические исследования, дана характеристика амниотической мемbrane с культивированными ЛСК и КПЭ роговицы человека в монокультуре и в составе многослойного культивирования.

### **Теоретическая и практическая значимость работы:**

1. В процессе работы разработана и внедрена патогенетически-обоснованная методика создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза (Патенты Украины: №65506, №86892, №87174).
2. С помощью разработанных методов проведена идентификация культивированных ЛСК и КПЭ роговицы человека в монокультуре и в составе многослойного культивирования (Патент №65507).
3. Изучены морфологические особенности пролиферативной активности, эффективности колонеобразования в условиях культивирования.
4. Патогенетически обоснована целесообразность криоконсервации ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека на поверхности амниотической мембраны с позитивным действие ДМСО при 10% содержании в качестве криопротектора с добавлением 20 % ЭТС в питательной среде DMEM/F12.

5. Даны рекомендации о целесообразном применении биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека с учетом патогенетического обоснования в регенерации эпителия роговицы.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой диссертации явилось последовательное применение на практике методик и подходов научного познания. Работа выполнена в дизайне сравнительного экспериментального исследования с использованием современных методов клеточной биологии и криобиологии: культивирование *in vitro*; программного замораживание; имmunогистохимии; спектрофотометрии; световой, сканирующей и электронной микроскопии; статистического анализа результатов. С патогенетических позиций оценены особенности пролиферативной активности, эффективности колонеобразования клеток роговицы глаза человека в условиях культивирования *in vitro*. В процессе исследования проведена идентификация культивируемых клеток роговицы глаза человека.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. В экспериментальном исследовании показано успешное выделение первичных культур ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека.
2. Иммуногистохимические исследования позволяют изучить патогенетические особенности культивирования клеточных культур в монослоином и послойном культивировании на базальной и стромальной сторонах АМ.
3. Проведен сравнительный анализ пролиферативной активности, эффективности колонеобразования в условиях культивирования.
4. Разработанная методика создания биоэквивалента предусматривает возможность патогенетически-обоснованных методик криоконсервации АМ с культивированными ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека.
5. Разработанная методика позволяет создать биоэквивалент на любой из сторон АМ с точки зрения перспективности его использования в регенерации роговицы.

**Степень достоверности и аprobация результатов исследования.** Степень достоверности результатов проведенных исследований определяется количеством наблюдений, с использованием адекватных методов исследования и подтверждается в процессе анализа материала. Все исследования выполнены на качественном и метрологически поверенном оборудовании лаборатории клеточного и тканевого культивирования ИНВХ им. В. К. Гусака. Составлен акт проверки первичной документации. Научные положения, выводы, сформулированные в диссертации, строго аргументированы и логически вытекают из результатов исследования. Тема диссертации и научный

руководитель утверждены на заседании Координационного совета ИНВХ им. В. К. Гусака, протокол №3 от 14 декабря 2017 г.

Результаты исследования доложены на следующих конференциях с международным участием специалистов: XII съезде офтальмологов Украины (г. Одесса, 2010г.), научно-практической конференции «Филатовские чтения» (г. Одесса, 2012г.), конференции «Биотехнологии в клинической медицине» (г. Донецк, 2012г.), мировом офтальмологическом конгрессе WOC (Aby Dhabi, 2012г.), VI Ежегодном симпозиуме «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (г. Москва, 2013г.), офтальмологическом конгрессе с международным участием, приуроченном к 80-летию Казанского НИИ глазных болезней «Иновационные технологии в повседневной офтальмологической практике» (г. Алматы, 2013г.), XIII съезде офтальмологов Украины (г. Одесса, 2014г.), II национальном конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва, 2015г.), мировом офтальмологическом конгрессе WOC 2014 (Tokyo, Japan, 2014г.), 39-й конференции молодых ученых ИПКиК НАН Украины «Холод в биологии и медицине» (г. Харьков, 2015г.), II Международном форуме Донбасса «Наука побеждать...болезнь» (г. Донецк, 2018г.).

**Реализация результатов исследования.** Результаты исследования внедрены в клиническую практику отделения патологии роговицы Института глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМНУ (г. Одесса), глазного отделения и лаборатории клеточного и тканевого культивирования ИНВХ им. В. К. Гусака МЗ ДНР (г. Донецк).

**Личный вклад соискателя.** Диссертация является самостоятельным научным трудом соискателя. Автором самостоятельно разработан дизайн и программа исследования. Проявлено непосредственное участие в сборе данных в проведении эксперимента, включенных в исследование. Совместно с руководителем лаборатории доктором медицинских наук, профессором Попандопуло А.Г. выбрана тема диссертационной работы, методологическая структура работы. Автором освоены методики, применяемые для получения и оценки результатов, выполнен анализ и описание результатов исследования, сформулированы основные положения и выводы, выносимые для защиты.

**Публикация материалов исследований.** По теме диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых изданиях ВАК (из них 2 - без соавторов), оформлено 4 патента на полезную модель, 11 тезисов в материалах научных конференций.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация изложена на 151 странице текста компьютерной верстки (123 страницы основного текста, 28 страниц списка литературы) и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, 4 главы, анализ и обобщение результатов исследования, заключение, выводы и практические рекомендации. Диссертация иллюстрирована 74 рисунками, 5 таблицами, 2 схемами. Список

литературы включает 224 источника, в том числе 60 отечественных и 164 иностранных авторов.

Особая признательность автора научным руководителям за идею работы и постоянную помощь при ее выполнении.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материал и методы исследования.** Исследование было проведено в 5 этапов, согласно поставленным задачам.

Первый этап посвящен разработке методики выделения ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека. Второй этап состоял из разработки метода получения биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека и изучению его морфологических свойств. Идентификация культур ЛСК и КПЭ в монокультуре и в многослойном культивировании оценивали на третьем этапе. Четвертый этап состоял из проведения криоконсервации биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека и оценки морфологических свойств (пятый этап).

Все исследования проводились в 2012-2013 гг. в лаборатории клеточного и тканевого культивирования Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака под руководством д. мед. н., профессора Попандопуло А.Г.

Иммуногистохимические исследования проводились в лаборатории «Новая диагностика плюс» патоморфологом Шатохиной Т.В.

Использованные образцы сертифицированной АМ (ПА-платекс амниотический офтальмологический, серия №ПАО/1035) были предоставлены Институтом проблем криобиологии и криомедицины (ИпКиК НАН Украины, г. Харьков) заместителем директора по научной работе Прокопюк О.С.

Проведенные исследования отвечают принципам Хельсинкской декларации, принятой Генеральной ассамблей Всемирной медицинской ассоциацией (1997-2000 гг.), конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1997 г.), соответствующим положениям ВОЗ и полностью исключает ограничение интересов пациента и нанесения вреда его здоровью и всем этическим требованиям, что подтверждено заключением комиссии по биоэтике ИНВХ им. В.К. Гусака МЗ ДНР протокол №1/5 от 14 марта 2022 г.

Для экспериментальных исследований были выделены клеточные линии роговицы глаза человека, полученные от пациента с диагнозом глаукома. Пациент не имел диабетического анамнеза (для исключения влияния метаболических аспектов), не принимал антибиотиков, глюкокортикоидов или химиотерапевтических препаратов, по крайней мере, за две недели до операции. Исследование проводилось добровольно, соответственно с положениями о биоэтике. В экспериментах использовали активно пролиферирующие клетки.

*Получение ЛСК и КПЭ роговицы.* Выделение клеточных культур проводили с сохранением условий асептики и антисептики. Для получения лимбальных эпителиальных клеток, содержащих в своем составе СК, выкраивали лимбальный трансплантант со всей окружности лимба цельного энуклеированного глаза, при этом достигалась равномерная толщина трансплантанта, не более  $\frac{1}{2}$  толщины склеры. Для этого металлическим лезвием проводился один круговой надрез по склере, отступая на 2 мм от прозрачной части роговицы на глубину 0,5 мм, и другой – по границе между лимбальной и прозрачной зонами роговицы. Далее на ту же глубину, перпендикулярно выполненному разрезу в сторону роговицы, производили 4 надреза на 3, 6, 9 и 12 часов, затем скальпелем отсепарировывали слой ткани на заданной глубине, придерживая лоскуты пинцетом, в результате получали лимбальные трансплантанты, представляющие собой полоску ткани шириной 2 мм и толщиной 0,5 мм по всей длине. Полученное корнеосклеральное кольцо помещали в стерильную чашку Петри  $d=60$  мм, несколько раз промывали раствором PBS, затем заливали питательной средой, содержащей DMEM/F12, L-глутамин, эмбриональную телячью сыворотку, пенициллин, стрептомицин при определенных соотношениях.

Поскольку в рамках данного исследования необходимо прикрепление лимбальных лоскутов методом экспланта, культуральные флаконы  $25 \text{ см}^2$  обрабатывали коллагеном и фибронектином.

Корнеосклеральное кольцо измельчали до размера  $2 \times 2$  мм и аккуратно помещали на дно культурального флакона, обработанного коллагеном или фибронектином. На 20 минут флакон помещали в термостат при  $t=37^\circ\text{C}$  в перевернутом положении.

Дальнейшее культивирование осуществляли в питательной среде DMEM/F12 1:1 (Dulbecco Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 НАМ, «Sigma», США), с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки («БиоЛоТ», Россия), 5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трасферрина, 5 мкг/мл гидрокортизона, 5 мкг/мл изопротеринола, 10 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF), 10 нг/мл фактора роста фибробластов (bFGF), по 100 ед/мл гентамицина,  $10^{-4}$  г/л стрептомицина в течение 28 дней в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при температуре  $37^\circ\text{C}$ , с 5% содержанием  $\text{CO}_2$  и 95% влажности. На протяжении этого периода наблюдали за сменой активности пролиферации клеток, их морфологией, отмечали временные интервалы изменений характеристик клеточных культур.

Выделение КПЭ роговицы глаза человека проводили следующим способом: скальпелем аккуратно соскабливали с поверхности центральной части роговицы глаза человека эпителий, помещали в чашку Петри 100 мм, механически измельчали, добавляли фермент, и согласно, протоколу проводили выделение. В дальнейшем культивирование проводили как культуру ЛСК. При

формировании монослоя клеточные линии пассировали 0,5 % раствором трипсина («Sigma», США) в соотношении 1:1 к раствору Версена («Биолот», Россия).

*Идентификация клеточных линий.* В настоящее время не существует окончательного списка антител, которые могут предположительно указывать на принадлежность к компартменту СК лимба. Для изучения их биологии – с одной стороны, и с другой – применения СК в клинике, среди предложенных маркеров с целью идентификации были выбраны следующие: p63, cytokeratin 19, cytokeratin 3/12, pan-cytokeratin, keratin sulfate, vimentin,  $\alpha$ -SMA, СД 34, ALDH3A1, c-kit CD 117, EGFR, TGFb3, ABCDG 2, integrin  $\beta$ 1.

Изучение экспрессии маркеров показывает, что между стволовыми и транзиторными клетками трудно провести четкую границу. Точная оценка фракции ЛСК затруднена методически, а также ввиду того, что часть транзиторных клеток еще сохраняют свойства стволовых. Между клетками наблюдается постепенный переход.

*Окраска плазматических мембран клеток флуоресцентным красителем.* Прижизненную окраску клеточных мембран ЛСК производили с помощью PKH67 Green Fluorescent Cell Linker for General Membrane Labeling и PKH26 Red Fluorescent Cell Linker for General Membrane Labeling («Sigma», США), (Lotze H., 2011г.), визуализация проводилась при помощи системы флуоресцентной микроскопии и обработки изображения Leica DMLS – DC –IM–50 и программ IM50 (версия 1.20, вып. 19, сист. №2083, лиц. №DN0185), Leica QWin Standart (Германия) при 100–кратном увеличении.

*Визуализация клеточных культур и гистологических препаратов с использованием методов микроскопии.* Визуализацию и фотодокументирование культур проводили при помощи инвертированного микроскопа Leica DM IL, рабочей станции для обработки изображений Leica QWin500 Standart (версия 2.3, сэр. №3069) и видеокамеры JVC TK–C1300E (Япония). Клеточные культуры микроскопировали при 40–, 100–, и 200–кратном увеличении (Завалева С., 2016г.).

*Получение гистологических препаратов.* При пассировании клеточные культуры наносили на адгезивные предметные стекла Super Frost Plus («Menzel», Германия) и культивировали в течение нескольких дней, используя определенную клеточность. После достижения монослоя, стекла высушивали на воздухе и проводили регидратацию в солевом фосфатном буфере (PBS), высушивали, фиксировали, погружая в холодный ацетон ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) на 2 минуты, затем осуществляли иммуногистохимические (ИГХ) окрашивания на специфические маркеры: p63, цитокератин 19, цитокератин 3/12, кератан сульфат, виментин,  $\alpha$ -SMA, CD 34, Ki 67.

Изучение гистологических препаратов осуществляли при помощи микроскопа Olympus AX 70 при увеличении 35–45–, соединенного с персональным компьютером.

*Оценка функциональных свойств.* Для сравнения пролиферативной активности культур ЛСК и КПЭ проводили ММТ– анализ клеточной пролиферации (MTT– Cell Proliferation Assay) (Canturk Z., 2016г.) на 14 день культивирования, поскольку к тому времени активно пролиферировали обе клеточные линии. Это количественный колориметрический анализ для измерения клеточной пролиферации, жизнеспособности и цитотоксичности, который основывается на превращении соли тетразолия, МТТ (methylthiazol tetrazolium, 3– [4, 5– диметилтиазол –2–ил]–2, 5–дифенилтетразолия бромид) в нерастворимые в воде темно–синие кристаллы формазана. Оптическая плотность полученного раствора измерялась с использованием фотометра для многофункционального анализа Synergy HT BioTek Instruments (США) с помощью программы KC4 System ID: U2TH–2H3M–80, License Number: 6DVK–L3TOV. Эта программа на основе построения стандартных МТТ– кривых.

*Оценка пролиферативного потенциала.* Подсчет культивированных клеток осуществляли с помощью камеры Горяева: для ЛСК до 60 суток культивирования, для клеток КПЭ до 50 включительно. Сделан теоретический расчет возможной клеточности при условии дальнейшего пассирования всего объема клеток.

*Морфофункциональное состояние АМ.* Для экспериментального исследования криозамороженный амнион размораживали при комнатной температуре, промывали, расправляли на стерильной фольге и разрезали на образцы необходимого размера. Амниотическая мембрана обладала прочностью и пластичностью, была полупрозрачна, поверхность выстлана кубическим эпителием.

*Методика создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека.* В качестве биологического субстрата была выбрана сертифицированная криозамороженная АМ и активно пролиферирующие клеточные линии ЛСК и КПЭ роговицы человека, протестированные на контаминацию к возбудителям инфекций.

Не составляет сложности определить базальную мембрану и стромальную сторону при первичной заготовке свежего амниона и помещения на нитроцеллюлозную бумагу. Стромальная сторона АМ шероховатая, не блестит, липкая, а сторона базальной мембранны гладкая, блестящая и не обладает адгезивными свойствами. Определенную трудность составляет дифференцировка сторон у АМ после криозамораживания. Стромальная сторона амниона утрачивает свою «липкость».

Данные исследований анатомо-функциональных особенностей биологических субстратов и морфо-функциональное состояние ЛСК и КПЭ позволили разработать технологию создания биоэквивалента роговицы, который отвечал бы всем техническим требованиям.

Нами была улучшена собственная методика получения биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека на поверхности базальной мембранны и стромальной стороне АМ, которая способствовала бы сохранению максимально возможного количества клеток при послойном культивировании (Попандопуло А.Г., 2014г.). В 8-ми луночное плато ( $\mu$ -Slide 8 well, IBIDI, GmbH), где каждая лунка  $1\text{cm} \times 1\text{cm}$  помещали по восемь образцов АМ стромальной стороной вверх и восемь – базальной мембранны. АМ плотно прилегала к пластику, наносили на поверхности амниона по 10 тыс. ЛСК в 200 мкл питательной среды DMEM/F12 1:1 («Sigma», США), содержащей 10% ЭТС, и ряд ростовых факторов до достижения необходимой клеточной плотности. Смену сред проводили каждые 24 часа в течение 4 суток. Культивирование осуществляли в стандартных условиях в  $\text{CO}_2$  инкубаторе, с влагосодержанием 95% при температуре  $37\text{C}^\circ$  (Гринь В.К. с соавт., 2011). На протяжении этого периода наблюдали за сменой активности пролиферации клеток, их морфологией. После достижения конфлуэнтного лимбального монослоя на поверхности АМ, наносили суспензию КПЭ роговицы и культивировали в течение 3–5 дней при тех же условиях. В качестве контроля использовали небольшие лоскуты АМ, помещенные в 24-луночное плато с питательной средой без добавления клеток.

Для изучения процессов, происходящих на поверхности субстрата и между монослоями культивированных клеток, после завершения культивирования проводились иммуногистохимические исследования.

Для сравнения динамики роста и пролиферации ЛСК и КПЭ на стромальной стороне АМ и на стороне базальной мембранны проводили ММТ-анализ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием лицензионного пакета «MedStart» (версия 3, сер. № MS000027) (Лях Ю.Е., 2006г.) и использованием адекватных методов биостатистики. Количественные характеристики случайных величин представлены в материалах диссертации преимущественно в виде средних значениях и стандартных отклонений.

**Результаты собственных исследований и их обсуждение.** Морфологическая культура ЛК не отличалась от кератиноцитов человека. С помощью фазово-контрастной микроскопии эти клетки можно разделить на две группы: голоклоны, клетки с максимальной способностью к пролиферации и клетки, имеющие вид дифференцированных кератиноцитов (рис.1). За 14 дней они производили от 20 до 50 тыс. мелких базальных камбимальных клеток с овальным несколько вытянутым ядром. Вторая группа представляла собой удлиненные клетки веретенообразной формы.

Выход клеток при первичном выделении в значительной мере зависит от количества прикрепленных на пластике микрофрагментов лимба. Для микрофрагментного типа характерно образование большего количества клеток за единицу времени, чем колонии, которые происходят от отдельных клеток.

В начальные сроки культивирования преобладают процессы пролиферации, поскольку происходит увеличение плотности клеточного пласта. После пассирования способность ЛК к самоорганизации и формированию агрегатов сохранялась.

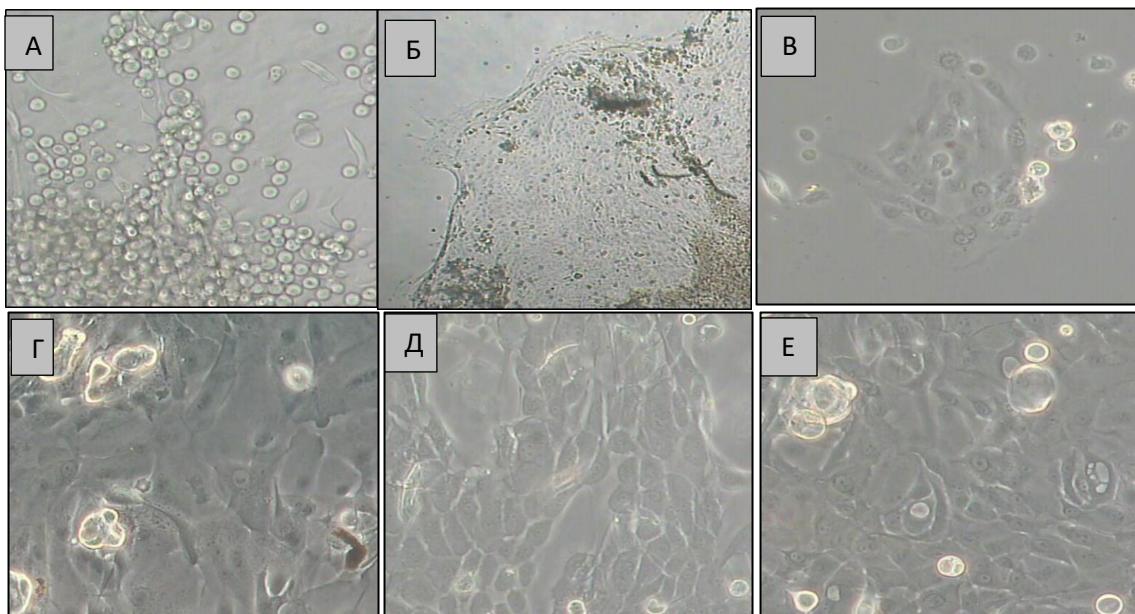


Рисунок 1 - Первичная культура ЛК на поверхности культурального пластика.

**А** - округлые базальные лимбальные клетки 4 сутки, фазово-контрастная микроскопия (ФКМ), окуляр x10, объектив x4. **Б** - миграция клеток из экспланта на 5-е сутки. **В** - лимбальные клетки 1 пассажа. **Г** - лимбальные клетки 2 пассажа. **Д** - лимбальные клетки 3 пассаж. **Е** - лимбальные клетки 4 пассажа, ФКМ, окуляр x10, объектив x20

На 7–14 сутки культивирования *in vitro* на дне культурального флакона колонии клеток, пролиферирующие от эксплантов, сливались между собой, образовывая монослои. Компактизованные клетки гоноцитов плотно прилегали друг другу, по периферии их окружали хорошо распластанные клетки призматической формы, дважды превышающие их в размерах, обладающие вертикальной анизоморфией. При пассировании клетки имели морфологическое строение сходное с эпителием.

Форма КПЭ была преимущественно три- и полигональная, для наиболее уплощенных клеток было характерно наличие небольших отростков. Клетки данного типа обладали высокой пролиферативной активностью и формировали плотные зоны роста. Помимо этих клеток имелись клетки округлой формы, гигантских размеров, очень сильно распластанные по поверхности

культурального флакона. Клетки характеризовались гомогенной цитоплазмой, хорошо заметным ядром и ядрышком.

При дальнейшем культивировании первичной культуры клетки распластывались по поверхности пластика, увеличивались в размерах. При этом они сохраняли форму и отростки. По мере увеличения количества клеток в культуре их отростки плотнее примыкали друг к другу, так что границы отдельных клеток не всегда были четко различимы. Клетки активно пролиферировали, перекрывая периферические участки цитоплазмы, друг друга. Плотность посадки клеток не оказывала существенного влияния на скорость пролиферации. Гетерогенность КПЭ в первичной культуре была сильно выражена (рис. 2).

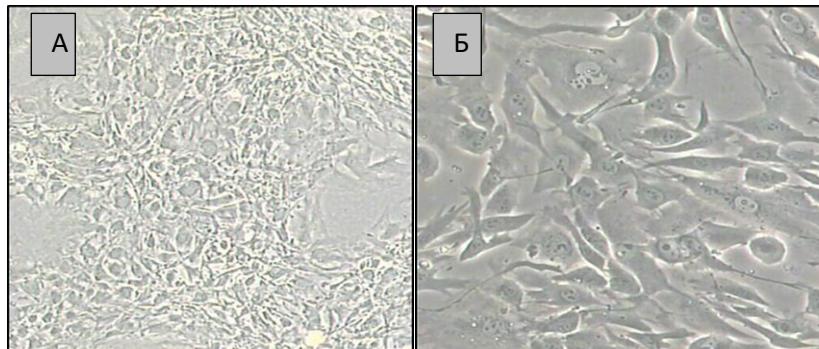


Рисунок 2 - **А** - первичная культура КПЭ, 14-е сутки культивирования. ФКМ, окуляр x4, объектив 10. **Б** - 21-е сутки культивирования культуры КПЭ, ФКМ, окуляр x10, объектив 10

Для культуры КПЭ было характерно наличие периодов торможения пролиферации на определенных этапах культивирования. Как правило, пролиферация замедлялась на 4–5-м пассаже. В этот период наблюдали большое число крупных распластанных клеток, имеющих полигональную, округлую и неправильную форму и неоднородную по плотности цитоплазму. Пролиферативную активность и динамику роста культуры КПЭ оценивали с использованием определения времени удвоения популяции при культивировании клеток в течение нескольких пассажах при одинаковой плотности посева ( $10^4/\text{см}^2$ ).

На ранних пассажах в культуре ЛК обнаруживались клетки экспрессирующие транскрипционный маркер стволовых/прогениторных клеток–p63 (рис.3 Г). Увеличение относительного числа экспрессирующих p63 может свидетельствовать об обогащении культуры стволовыми клетками, обладающими высоким пролиферативным потенциалом. Следует отметить, что на 12–16 пассажах экспрессия p63 снижалась, с 0,85% к концу культивирования снизилась до 0,34 %, но к 5 пассажу наблюдался резкий подъем до 1,17 %, вероятно, это связано с тем, что стволовость сохраняется в культуре в течение 1,5 месяцев.

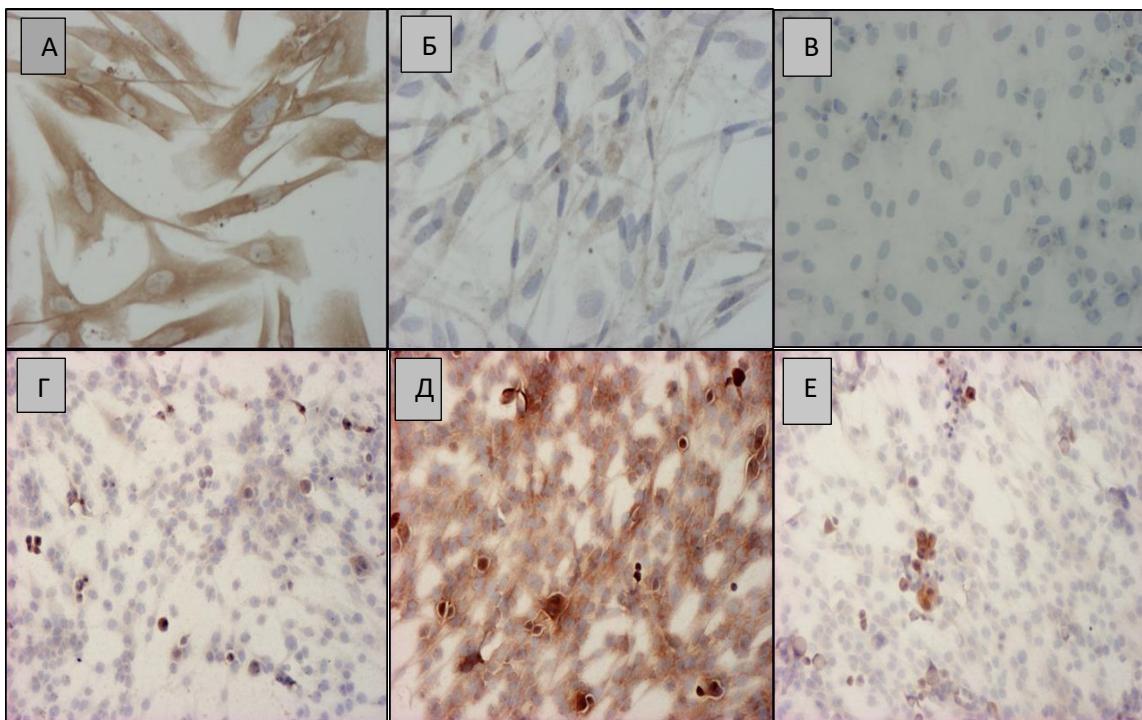


Рисунок 3 - Иммуногистохимическое позитивное окрашивание: **А** - vimentin ЛСК, неоднородность упаковки. **Б** - экспрессия cytokeratin 3/12. ФКМ, окуляр x10, объектив 10. **В** - иммуногистохимическое окрашивание cytokeratin 19. **Г** - P63. **Д** - ALDH3A1. **Е** - CD 117, ФКМ, увеличение  $\times 75$

Положительное окрашивание виментином–белком промежуточных филаментов, подтвердило прогениторное происхождение клеток. (рис.3 А). На поздних пассажах позитивное окрашивание цитокератина 3/12 характерно для дифференцированных ЛСК (рис.3 Б). На 5–м пассаже колонии ЛСК не имели четкого центра, они состояли из клеток, отличающихся по размеру и характеру упаковки. Основная часть клеток характеризовались удлиненной формой и круглым или удлиненным ядром с хорошо просматриваемым ядрышком.

Из эпителиальных маркеров был выявлен цитокератин 19 (рис.3 В), окрашивающий базальные клетки лимба. Следует отметить, что экспрессия характерна для 80% клеток и одновременно с этим, более 95% клеток экспрессировали виментин (рис. 3 А).

Это свидетельствует о том, что значительная часть популяции может одновременно экспрессирует два маркера – мезенхимный и эпителиальный.

Исследуемые клетки не экспрессировали следующие маркеры: CD 34,  $\alpha$ -SMA (альфа гладко–мышечный актин).

По результатам окрашиваний наблюдалось плавное снижение экспрессии специфического белка ALDH3A1 в процессе культивирования лимбальных клеток: с 91% на втором пассаже и 67,6 % на шестом соответственно (рис.4 В).

Цитоплазматическое окрашивание CD 117 маркера клеток – предшественников с возрастанием пролиферации увеличивалось с 2,55 % до

10,89 %. Для 5 пассажа характерно резкое увеличение экспрессии до 26,06 % (рис.4 А). Маркер стволовых клеток CD 117 имеет большое значение в выживаемости клеток, пролиферации и дифференцировки.

Наличие маркера ЦК 3/12 показывает дифференцированный потенциал популяции лимбальных клеток: с 42,3 % до 40,78, но с 3 по 5 пассаж наблюдалось увеличение в 2 раза (рис.4 Г).

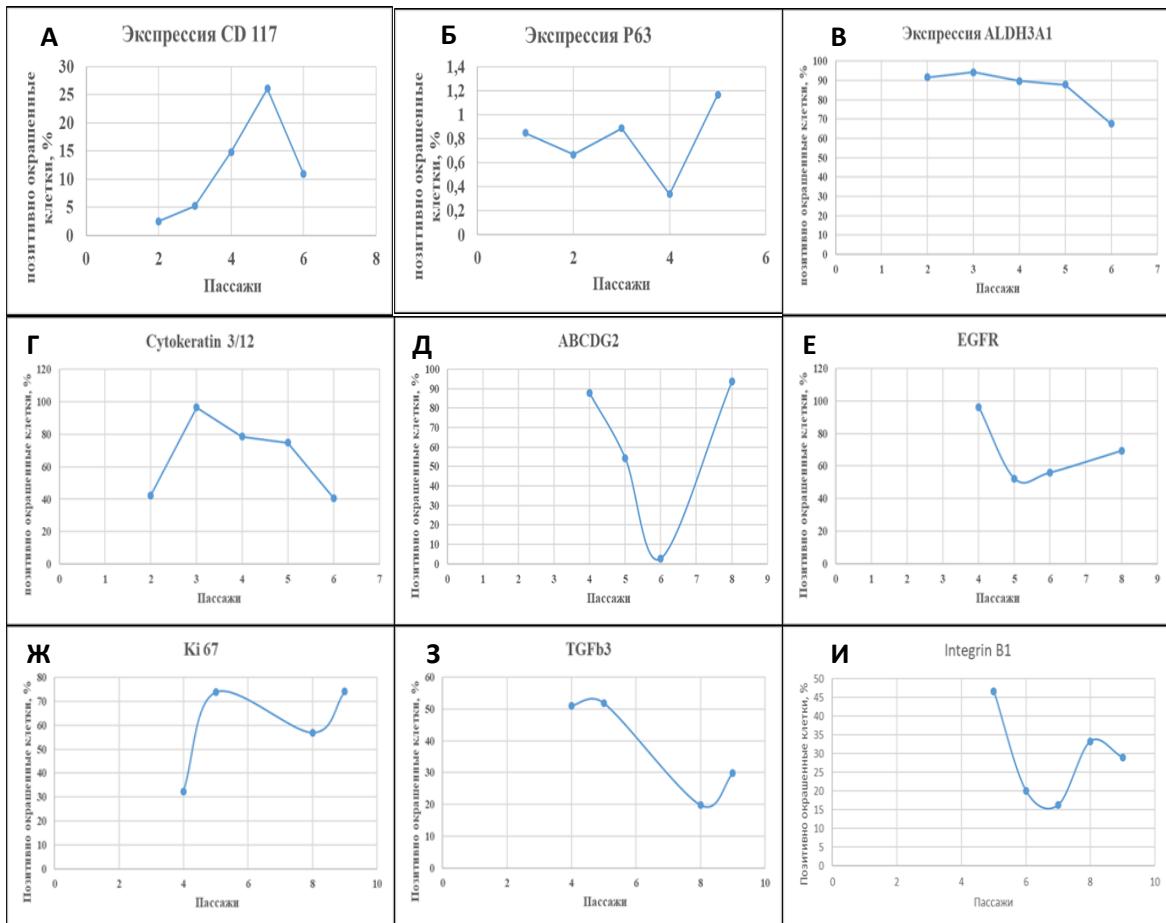


Рисунок 4 - экспрессия антител: А - CD 117, Б - P63, В - ALDH3A, Г - Cytokeratin 3/12, Д - ABCDG2, Е - EGFR, Ж - Ki67, З - TGFb3, И - Integrin  $\beta$ 1

На втором пассаже наблюдалось высокая экспрессия ABCDG2 87,69%, к третьему пассажу составляла 54,34%, снижалась к четвертому пассажу 27,60% и возрастала к 93,69% окрашенных клеток на пятом пассаже (рис.4 Д). Вероятно, базальные эпителиальные лимбальные клетки обладали метаболической активностью, а также способностью противостоять разрушающему действию кислородных радикалов при повышении редокс-статуса (поддерживается специализированными ферментами в результате постоянного притока энергии). Нарушение этого статуса вызывает повышенный уровень токсичных реактивных форм кислорода, таких как пероксиды и свободные радикалы.

По мнению многих исследователей ABCDG2 может быть одним из важных маркеров для идентификации базальных лимбальных клеток роговицы.

Таким образом, полученная культура ЛСК обладала высокой гетерогенностью, после достижения клетками голоклонов конфлюентного монослоя, преобладающими по морфологическим признакам являлись лимбальные клетки. Существование фибробластоподобных клеток в культуре доказывает наличие дифференцированных клеток. На 4 пассаже характерна экспрессии EGFR 96,19%, 5 пассаж и 6 характеризовался равномерно окрашиванием клеток соответственно 52,15% и 55,82%. Для 8 пассажа характерен подъем до 69, 23% (рис.4 Е). Рецептор эпидермального фактора роста существует на поверхности клеток и активируется путем связывания его специфическими лигандами, стимулирует клеточный рост и клеточную дифференцировку эпителиального покрова.

Экспрессия Ki67 с четвертого пассажа с 32,22% к пятому увеличилась до 73,78%. На восьмом пассаже количество позитивно окрашенных клеток составило 56,95%. На девятом пассаже экспрессия составила 74,05% (рис.4 Ж).

Экспрессия TGFb3 на четвертом пассаже составила 50,97% окрашенных клеток, на 5 пассаже составила 51,87, к 8 пассажу экспрессия снизилась до 19,81%. К девятому пассажу характерно увеличение экспрессии до 29,77%. Можно предположить, что высокое содержание TGFb3 свидетельствует о его наличие в цилиарных отростках, на клеточной поверхности и во неактивной форме внеклеточного матрикса (рис.4 З). Факторы роста семейства TGF являются одними из ключевых медиаторов фиброза. TGF стимулирует эпителиально - мезенхимальный переход клеток эпителия роговицы. Не исключено, что избыточная экспрессия TGFb3 может привести к образованию миофибробластов в результате эпителиально- мезенхимального перехода клеток эпителия роговицы и активировать эндо- или экзогенных фибробластов.

Экспрессия Integrin  $\beta$ 1 (рис.4 И) была волнообразной: на пятом пассаже 46,66%, к седьмому снизилась до 16,24, на восьмом составляла 33,27% и к девятому снизилась до 28, 93%. Интегрины принимают участие во взаимодействии клеток с белками внеклеточного матрикса и другими клетками. Было высказано предположение о возможном участие этих молекул в адгезионных взаимодействиях между стромальными и эндотелиальными клетками.

Четвертый и восьмой пассажи характеризовались высокой экспрессией keratin sulfate 73,89% и 75,81% соответственно, но к пятому пассажу заметно снижение до 38,94%. Позитивно окрашенных клеток к шестому пассажу наблюдали 55,65%. В роговице высокое содержание Keratan sulfate, по-видимому, связано с поддержанием уровня гидратации ткани, критического для прозрачности роговицы. Keratan sulfate, один из основных протеогликанов роговицы, обладает водосвязывающими свойствами.

Таким образом, выделенные ЛСК из зоны палисадов Фогта, являются жизнеспособными, сохраняя плюрипотентность. Это свидетельствует о пути образования малых и больших колоний клеток с неповрежденным цитоскелетом. Наличие СК 3/12 указывает на дифференциальный потенциал в культуре. Пролиферирующие клетки находятся в базальном слое лимба, что подтверждено высокой экспрессией ALDH3A1, CD 117, СК 3/12 и низкой, по сравнению с предыдущими маркерами, p63.

*Морфофункциональное состояние амниотической мембраны.* По данным атомно-силового микроскопа Bioscope® с режимом сканирования PeakForce Tapping QNM были получены высококачественные изображения с использованием силы до 50 пН. Количественное наномеханическое картирование свойств, включая: адгезию, деформацию, модуль упругости (Юнга), энергию диссипации (рис.5).

По данным сканирующего электронного микроскопа JEM 100C (JEOL Япония) поверхность АМ интактная (Рис.6.). Выраженных признаков повреждения клеток АМ после размораживания не было отмечено.

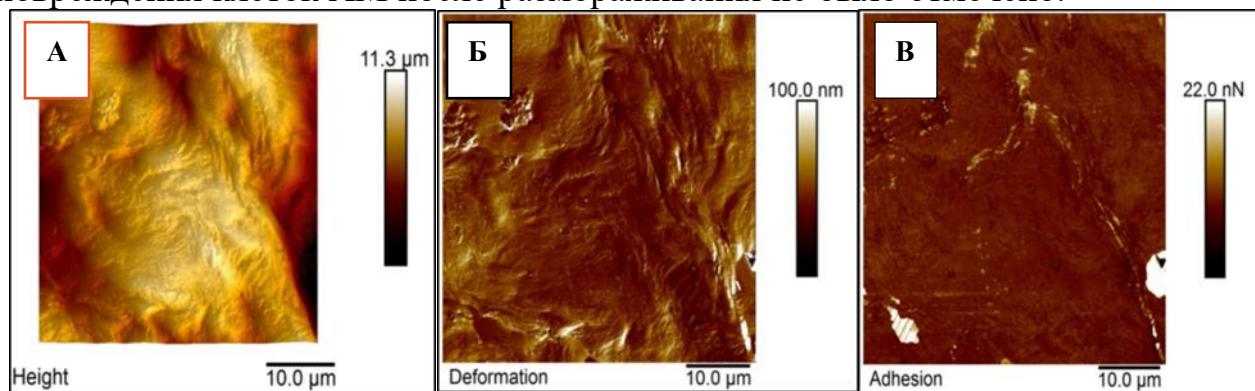


Рисунок 5 - данные атомно-силового микроскопа Bioscope® с режимом сканирования PeakForce Tapping QNM. Высушенная АМ в воздухе, разрешение 512x512 точек, скорость сканирования 0.2 Гц. Наномеханические свойства: **А** - высота, **Б** - деформация, **В** - адгезия

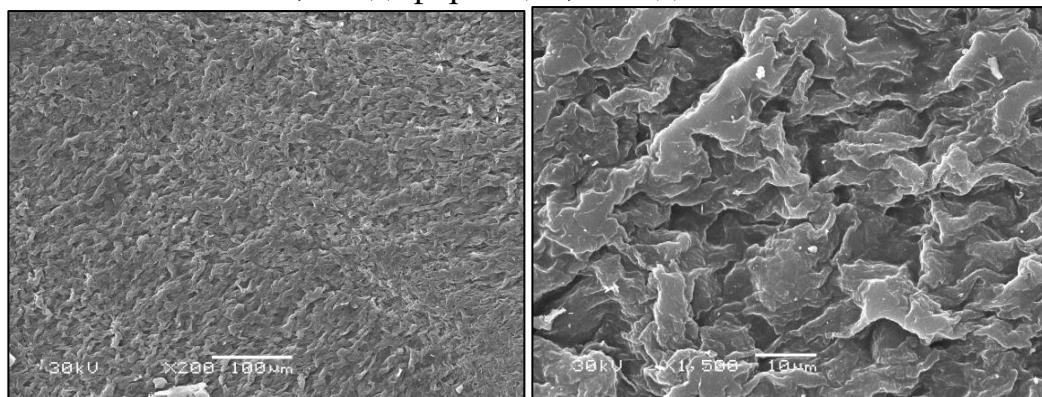


Рисунок 6 – стромальная сторона АМ. СЭМ: **А** - увеличение  $\times 200$ , **Б** - увеличение  $\times 1,500$

*Морфофункциональное состояние лимбальных стволовых клеток роговицы на стромальной стороне амниотической мембраны.* При культивировании ЛСК на стромальной стороне АМ активная клеточная пролиферация начиналась в первые сутки. Высокая пролиферативная активность ЛСК вероятнее всего, обусловлена выбросом в ткани значительного количества биологически активных веществ – пролиферативных мессенджеров, которые по своей природе являются митогенами и стимулируют клеточную пролиферацию. При микроскопии в первые сутки морфология ЛСК на стромальной стороне АМ аналогична в колониях, мигрующих по пластику, описанных выше. Можно предположить, что коллективная миграция ЛСК, генерирующие из голоклонов является универсальным механизмом эпителизации. При многослойном культивировании происходила постепенная очистка культуры от слабоадгезивных клеток, и на 3–е сутки наблюдался более равномерный рост клеток по всей поверхности АМ. На 4–е сутки многослойного культивирования осуществляли оценку пролиферативной активности (табл. 1) культур ЛСК при помощи МТТ–анализа.

Таблица 1 - Пролиферативная активность ЛСК на стромальной стороне АМ на 4 сутки культивирования ( $\bar{x} \pm \sigma$ ) $10^4$  (ММТ–анализ).

Группы	0 сутки	1 сутки	2 сутки	3 сутки
Контроль (n=10)	$10^4$	$1,31 \pm 3,4$	$1,71 \pm 4,1$	$2,13 \pm 4,9$
I группа (n=10)	$10^4$	$1,42 \pm 4,3$	$1,86 \pm 4,85$	$2,45 \pm 5,2$

Примечание: наличие достоверных различий с контрольным значением с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

Для поддержания жизнеспособности ЛСК необходимо их взаимодействие с уникальной комбинацией специфических факторов роста: эпидермального фактора роста (EGF) и фактора роста фибробластов (bFGF).

*Морфофункциональное состояние клеточного состава плоского эпителия роговицы на стромальной стороне амниотической мембраны.* На 4–е сутки на клеточный слой лимбальных клеток наносили суспензию КПЭ в том же объеме питательной среды и культивировали в течение 3–4 дней.

В таблице 2 представлены сводные данные пролиферативной активности КПЭ контрольной и первой группы (МТТ–анализ). Из таблицы видно, что пролиферативная активность на 2–е сутки больше в 1,02 раза, а на 3 сутки в 1,12 раза.

Таблица 2 - Пролиферативная активность КПЭ на стромальной стороне АМ на 4 сутки культивирования ( $\dot{x} \pm \sigma$ ) $10^4$  (МТТ-анализ).

Группы	0 сутки	1 Сутки	2 сутки	3 сутки
Контроль (n=10)	$10^4$	$1,19 \pm 0,045$	$1,39 \pm 0,029$	$1,89 \pm 0,041$
I группа (n=10)	$10^4$	$1,23 \pm 0,065$	$1,42 \pm 0,075$	$2,13 \pm 0,56$

Примечание: наличие достоверных различий с контрольным значением с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

*Морфофункциональное состояние лимбальных стволовых клеток роговицы на базальной стороне амиотической мембранны. Культивирование ЛСК на базальной стороне АМ осуществлялось так же как культивирование на стромальной стороне АМ. Для базальных лимбальных клеток характерна цилиндрическая форма, среди этих клеток большое количество камбимальных, т.е. стволовых. Такие клетки имели высокую пролиферацию (в логарифмической фазе роста время удвоения составляло 14–16 часов), отчетливо идентифицированы ядра с четкими видимыми ядрышками. Шиповатые клетки полигональной формы вклинивались между базальными клетками и составляли совокупность плотно сформированного слоя. Следующий слой плоских клеток, чьи ядра имеют палочковидную форму, расположены параллельно поверхности пласти.*

Из таблице 3 видно, что особых различий в процессе культивирования на базальной стороне ЛСК не наблюдалось по сравнению с пролиферативной активностью ЛСК, культивированных на стромальной стороне АМ.

*Морфофункциональное состояние клеточного состава КПЭ роговицы на базальной стороне амиотической мембранны. Полученные в результате исследований данные о культивировании КПЭ на стромальной стороне и базальной мемbrane АМ (табл. 4) достоверных различий не отмечалось.*

Таблица 3 - Пролиферативная активность ЛСК на базальной стороне АМ на 4 сутки культивирования ( $\dot{x} \pm \sigma$ ) $10^4$  (МТТ-анализ).

Группы	0 Сутки	1 Сутки	2 сутки	3 сутки
Контроль (n=10)	$10^4$	$1,27 \pm 2,6$	$1,7 \pm 3,9$	$2,4 \pm 3,1$
I группа (n=10)	$10^4$	$1,37 \pm 2,9$	$1,89 \pm 4,12$	$2,25 \pm 2,2$

Примечание: наличие достоверных различий с контрольным значением с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

Таблица 4 - Пролиферативная активность КПЭ на базальной стороне АМ на 4 сутки культивирования ( $\bar{x} \pm \sigma$ ) $10^4$  (МТТ-анализ).

Группы	0 Сутки	1 сутки	2 сутки	3 сутки
Контроль (n=10)	$10^4$	$1,13 \pm 0,097$	$1,28 \pm 0,03$	$1,79 \pm 0,039$
I группа (n=10)	$10^4$	$1,21 \pm 0,07$	$1,41 \pm 0,069$	$2,07 \pm 0,47$

Примечание: наличие достоверных различий с контрольным значением с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

Часть образцов культивированных ЛСК и КПЭ на поверхности АМ окрашивали на гемотоксилин и эозин, другую часть по Романовскому–Гимзе. При микроскопии клеточные монослои ЛСК и КПЭ роговицы на гистологических препаратах не дифференцировались. На окрашенных гемотоксилином и эозином препаратах (рис.7) видно, как прикрепившиеся к субстрату клетки, основной своей частью, включая ядро, располагается во втором слое пласти, контактируя своей базальной поверхностью с такими же следующими за ней клетками.

При изучении гистопрепараторов, использованных в качестве контроля, наблюдали отсутствие роста клеток самой АМ, т.е. другими словами она инертна. Окраска на Ki67 показала отрицательный результат.

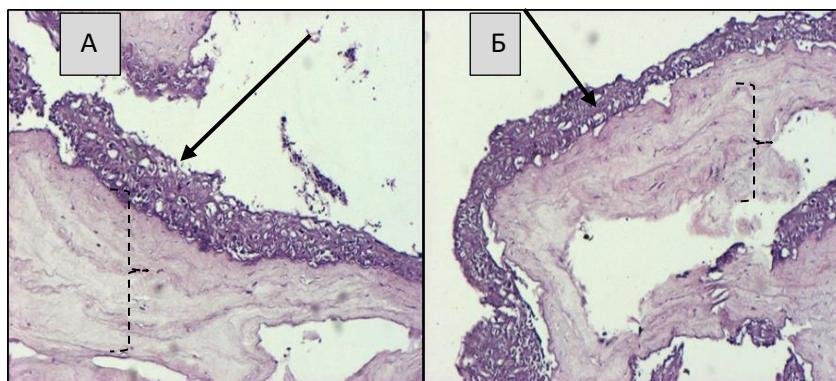


Рисунок 7 - окраска гемотоксилином и эозином: А - культивированные ЛСК и КПЭ (черная стрелка) на поверхности стромальной стороны АМ (пунктирная скобка). Б - культивированные ЛСК и КПЭ (черная стрелка) на базальной стороне АМ (пунктирная скобка). ФКМ, окуляр  $\times 10$ , объектив  $\times 4,5$

*Криоконсервирование лимбальных стволовых клеток и клеток плоского эпителия роговицы на поверхности амиотической мембране.* После достижения необходимой клеточности на поверхности субстрата, образцы АМ с

культивированными монослоями ЛСК и КПЭ помещали в криопакет размером 2×3 см (Nunc, Германия) в культуральной среде, содержащей 20% ЭТС и 10% ДМСО и запаивали. Затем криоконсервировали со скоростью 1°C/мин до -80°C по протоколу фирмы производителя с последующим погружением в жидкий азот. После хранения в жидким азоте, образцы размораживали, удаляли криопротектор и проводили иммуногистохимические исследования.

Детальный анализ изменений морфологии клеток до и после криоконсервирования проводили на инвертированном лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 550 META (Carl Zeiss, Германия) (рис.8) с использованием программного обеспечения LSM 510 ver. 4.2 (Carl Zeiss, Германия). На рисунке черной стрелкой отмечены клетки, сползающие с поверхности АМ, впервые минуты размораживания, черной скобкой отмечена АМ. Выраженных признаков повреждения клеток после размораживания криоконсервированного биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека не было отмечено.

Процесс криоконсервирования способен вызывать нарушение морфологических и метаболических свойств клеток, что в дальнейшем может привести к их гибели. Процедура замораживания-оттаивания клеток, как наиболее повреждающий этап в процессе криоконсервирования приводит к существенным изменениям в работе окислительно-восстановительной системе (рис.8.). После криоконсервирования количество сохранных и жизнеспособных СК во многом зависит от метода выделения и использованного криопротектора.

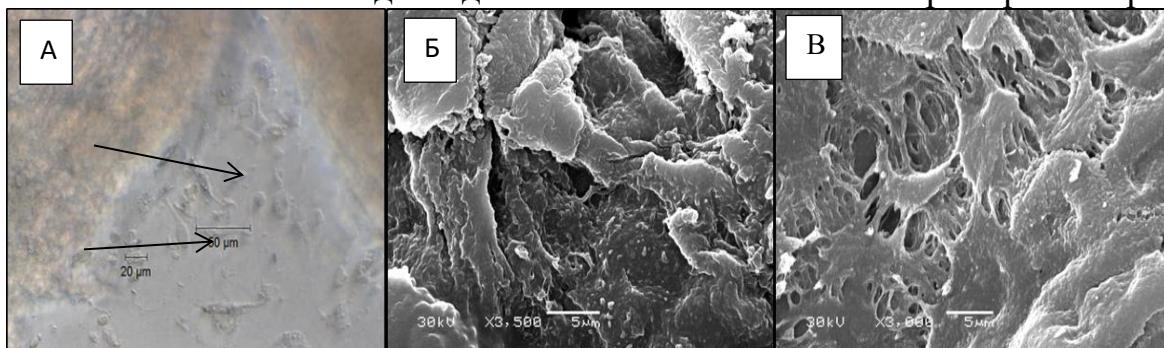


Рисунок 8 - 1-е часы после размораживания криоконсервированной АМ с культивированными ЛСК и КПЭ. А - сканирующий микроскоп Zeiss LSM 550 META. Б, В - сканирующий электронный микроскоп JEM 100C (JEOL Япония)

Выраженных признаков повреждения клеток АМ после размораживания не было отмечено (рис.8 Б, В). Степень адгезии и распластывание ЛСК на субстрате оценивали с использованием электронной микроскопии (рис.8). Клетки характеризовались окружлой формой, их поверхность была сравнительно гладкой, содержащей различное количество мелких везикул. Выраженных повреждений клеток после консервирования не было отмечено.

Как было показано в работе (Petrenko Y., 2013г.) жизнеспособность деконсервированных клеток роговицы после 2 ч рекультивирования может значительно отличаться от первоначальной жизнеспособности, полученной после отогрева. Это может быть вызвано запуском апоптических и некротических процессов в клетках, которые не выявляются при определении их жизнеспособности непосредственно после отогрева.

Фундаментальным свойством клеток является способность к прикреплению и распластывание по поверхности матрикса (Bliokh Zh.L., 1997г.). В процессе распластывания разделяют три фазы: прикрепление (P0), быстрое распластывание (P1) и медленное распластывание с дальнейшей поляризацией (P2). Первая фаза короткая, состоит из нескольких минут и зависит от адгезивной поверхности субстрата и присутствия сыворотки в питательной среде для культивирования. Вторая непродолжительная, характеризуется быстрым ростом площади клетки за счет образований протрузий и ретракций. Самая продолжительная фаза- третья. Характеризуется медленным ростом, сокращением клетки и образованием устойчивых клеточных адгезий.

Распластывание ЛСК и КПЭ является сложным и многофазным процессом. Потеря способности клетки к движению, поляризации и переориентировке при изменении направления растяжения субстрата напрямую зависит от потери скорости поляризации актина на краю клетки.

Для понимания изменений морфологии ЛСК и КПЭ в процессе послойного культивирования необходимы дополнительный анализ кинетики, в частности изучения роли различных элементов цитоскелета, а именно системы микротрубочек и актиновых филаментов, обеспечивающих прикрепление и распластывание на поверхности субстрата.

При этом показано влияние степени адгезии и распластывания культивированных клеток к поверхности субстрата на их устойчивость к процессу криоконсервации. Показано, что для данного способа культивирования клеток роговицы не характерно падение жизнеспособности после криоконсервации.

Полученные результаты исследования позволяют сделать заключение, что культивирование ЛСК и КПЭ на стромальной стороне и базальной мембране АМ по данным иммуногистохимических исследований на специфические антитела (p63, cytokeratin 19, cytokeratin 3/12, pan-cytokeratin, keratin sulfate, vimentin,  $\alpha$ -SMA, СД 34, ALDH3A1, c-kit CD 117, EGFR, TGFb3, ABCDG 2, integrin  $\beta$ 1) свидетельствуют о том, что нет существенных отличий для создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека.

Таким образом, в работе показана патогенетически-обоснованная возможность криоконсервации ЛСК и КПЭ на поверхности АМ в питательной среде DMEM/F12 с содержанием 20% ЭТС и добавлением 10% ДМСО при двухступенчатом программном замораживании, позволяющая сохранить

ультраструктуру ткани, а также способность ЛСК и КПЭ сохранять их общебиологические и специфические морфофункциональные свойства и потенциал.

*Оценка функционального состояния послойного культивирования лимбальных стволовых клеток и клеток плоского эпителия на стромальной стороне и базальной мембране амниотической мембране.* При сравнительном анализе культивирования клеточных линий на базальной мембране и стромальной стороне амниона не наблюдалось изменения в морфологии культивированных клеточных линий и в морфологии самого субстрата. Исходя из незначительных различий показателей пролиферативной активности, можно свидетельствовать о целесообразности использования для культивирования различных линий обеих сторон амниона.

Анализируя гистологические препараты можно утверждать, что использование адгезивных клеток ЛСК и КПЭ способствует эффективному взаимодействию с поверхностью АМ (рис.9).

Принимая во внимание тот факт, что каждая ткань является уникальной и универсального протокола не существует, выбранный метод выделения первичной культуры зависит не только от возраста донора, метода выделения, но и от питательной среды, с необходимыми, на усмотрение биолога, дополнительными ростовыми факторами, а также условиями культивирования.

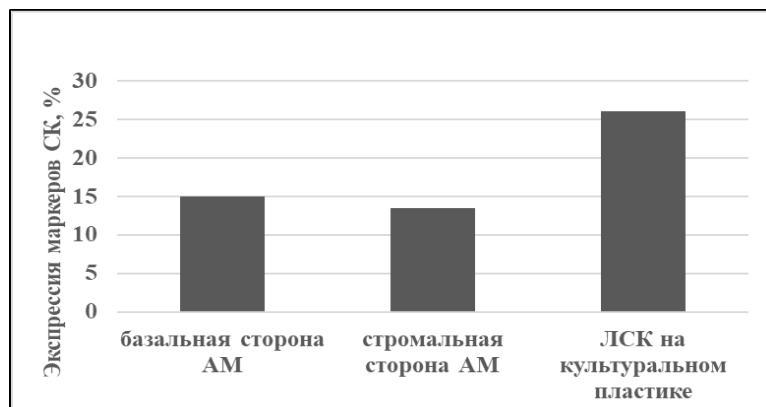


Рисунок 9 - экспрессия предполагаемых маркеров стволовых клеток Р63, CD117, Ki67 на базальной стороне АМ и стромальной стороне АМ и ЛСК на культуральном пластике

Полученные в работе результаты открывают новое направление криобиологии-криоконсервирование клеточных культур роговицы глаза человека в составе биоинженерной конструкции. Развитие этого направления существенно увеличит роль биотехнологий в регенеративной медицине, криобиологии в клеточной биологии и тканевой инженерии.

Применение патогенетически-обоснованной методики создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека является

перспективным методом, позволяющим использовать в качестве субстрата любую ориентацию АМ: базальную мембрану или стромальную сторону для культивирования клеток роговицы глаза. Наличие криоконсервированного биоэквивалента в достаточном количестве, является благоприятным фактором для применения в офтальмохирургии при различных патологических состояниях роговицы, вызванных синдромом лимбальной клеточной недостаточности.

## ВЫВОДЫ

1. В исследовании предложено концептуальный подход и новое решение актуальной научной проблемы по патогенетическому обоснованию создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности создания многослойного биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека.

2. Изучена возможность получения первичных клеточных культур ЛСК и КПЭ роговицы человека. Исполненная технология позволяет сохранить пролиферативные свойства на уровне (скорость пролиферации лимбальных клеток соответствует скорости пролиферации мезенхимальных клеток, скорость пролиферации клеток плоского эпителия соответствует скорость пролиферации эпителиальных клеток). Профиль экспрессии поверхностных маркеров при длительном культивировании соответствует профилю маркеров в нативной культуре. Для ЛСК характерна экспрессия p63, CK3/12, CK19, ABCDG2, ALDH3AI, CD117, keratan sulfate, TGFb3, EGFR, Ki67, integrin $\beta$ 1 и отсутствие следующих маркеров: СД 34,  $\alpha$ -SMA, что позволяет говорить об адекватном режиме первичного выделения и культивирования. Для КПЭ характерна экспрессия маркеров эпителиальных клеток (vimentin, pan-cytokeratin).

3. Патогенетически-обоснованные методики заселения амниотической мембраны позволяют добиться равномерного распределения клеток на поверхности с сохранением их адгезивных и пролиферативных свойств. В обеих методиках культивирования ЛСК и КПЭ на базальной мембране и стромальной стороне амниотической мембраны статистических достоверных различий не наблюдалось.

4. Для формирования многослойного биоэквивалента поверхностных слоев роговицы по предложенной методике не существует принципиального отличия для проведения культивирования различных клеточных линий.

5. Морфофункциональное состояние стволовых клеток лимба в 3-х мерном матриксе существенно не меняется, исходя из показателей скорости адгезии, пролиферации, экспрессии поверхностных маркеров.

6. При криоконсервации морфологические свойства амниотической мембраны и культивированных клеток роговицы человека сохраняются.

7. Предложенные подходы к созданию биоэквивалента поверхностных слоев роговицы человека могут быть реализованы на практике и в клинических разработках для восполнения дефицита ЛСК поврежденного эпителия роговицы.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для получения первичных культур ЛСК, содержащих в составе СК и КПЭ роговицы человека для дальнейшего культивирования целесообразно использовать биоптаты лимбальной зоны роговицы человека, с дальнейшим выделение миграционным способом, методом экспланта.

2. Для идентификации лимбальных клеток, содержащих в составе стволовые, может рекомендоваться следующие антитела: p63, cytokeratin 19, cytokeratin 3/12, pan- cytokeratin, ki67, keratin sulfate, vimentin,  $\alpha$ -SMA, СД 34, ALDH3A1, c-kit CD 117, EGFR, TGFb3, ABCDG2, интегрин  $\beta$ 1.

3. Для идентификации КПЭ целесообразно выбрать маркеры эпителиальных клеток: vimentin и pan- cytokeratin.

4. Целесообразно использовать АМ как потенциальный субстрат, адгезивный для клеточных элементов при длительном культивировании ЛСК и КПЭ в монослое, неспособного терять функциональные характеристики. Культивирование поверхностных слоев роговицы глаза человека на стромальной стороне и базальной стороне АМ существенных различий не обнаруживает.

5. Патогенетически-обоснованные методики обеспечивают возможность криоконсервации ЛСК и КПЭ на поверхности АМ в питательной среде DMEM/F12 с содержанием 20% ЭТС и добавлением 10% ДМСО при двухступенчатом программном замораживании, что существенно позволяет сохранить ультраструктуру ткани, а также способность ЛСК и КПЭ сохранять их морфофункциональные свойства и потенциал.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

- Сухина, Л.А. Случай применения культивированных фетальных фибробластов в лечении тяжёлого термохимического ожога лица, век и глазного яблока / Сухина Л.А., Бережная М.С., Попандопуло А.Г., **Кавелина А.С.** // Вісник невідкладної і відновної медицини. Науково-практичний журнал. - 2009. - Т.10. - №1. – С. 133–135. (Лично соискателем выполнен подбор информации, культивирование клеток *in vitro*, анализ результатов). *В статье нашли отражение основные положения главы 1.*
- Пасечникова, Н.В. Эффективность клеточной терапии на модели нейротрофической кератита (кератопатии) / Пасечникова Н.В., Дрожжина Г.И, Иванова О.Н., Гайдамака Т.Б., Попандопуло А.Г., **Кавелина А.С.** // Медицина

сьогодні і завтра. Науково-практичний журнал – 2011. - № 1–2. (50–51). – С. 213–216. (Лично соискателем выполнен подбор информации, культивирование клеток *in vitro*, анализ результатов). *В статье нашли отражение основные положения главы 1.*

3. Попандопуло, А.Г. Роль лимбальних клеток в регенерации роговиці / Попандопуло А.Г., **Кавелина А С.**, Иванова О.Н., Дрожжина Г.И. // Науково-практичний журнал Таврійський медико-біологічний вісник. - 2013. – Т. 16, №1, ч.2, (61). – С.158-160. (Лично соискателем выполнен подбор информации, анализ результатов, литературное оформление, подготовка к печати). *В статье нашли отражение основные положения главы 1.*

4. Пасечникова, Н.В. Получение трехмерного трансплантанта лимбальных клеток роговицы / Пасечникова Н.В., Гринь В.К., Дрожжина Г.И., Попандопуло А.Г., Иванова О.Н., **Кавелина А. С.** // Програма Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнології в клінічній медицині». Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. -Том 13, №1. – С.99–102. (Лично соискателем выполнен подбор информации, анализ результатов, литературное оформление, подготовка к печати). *В статье нашли отражение основные положения главы 2.*

5. **Кавелина А.С.** Культивирование адгезивных клеточных культур на мягких контактных линзах / А.С. Кавелина // «Весник» Харьковского нац. университета им.В.Н.Каразина. – 2014. -№1126. - Выпуск 22. - С.8–15. (Лично соискателем выполнен подбор информации, анализ результатов, литературное оформление, подготовка к печати). *В статье нашли отражение основные положения главы 2.*

6. **Kavelina A.S.** Creation of cornea biograf / A.S. Kavelina // The Jornaul of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series: biology. 2014. -Issue 21. - №1112. - Р.7-12. (Лично соискателем выполнен подбор информации, анализ результатов, литературное оформление, подготовка к печати). *В статье нашли отражение основные положения главы 2.*

7. **Кавелина А.С.** Влияние ориентации криоконсервированной амниотической мембранны на культивирование клеток роговицы глаза человека / А.С. Кавелина, А.Г. Попандопуло, А.И. Кравченко // Актуальные проблемы экологической и клинической биохимии. – 2019. -№6(156). –С.158-163. (Лично соискателем выполнен подбор информации, анализ результатов, литературное оформление, подготовка к печати). *В статье нашли отражение основные положения главы 4.*

8. **Кавелина А.С.** Влияние криоконсервации на морфологию культивируемых клеток роговицы глаза человека на амниотической мемbrane /А.С. Кавелина, А.Г. Попандопуло, А.И. Кравченко // Актуальные проблемы экологической и клинической биохимии. – 2022. -№4(172). –С.228-234. (Лично соискателем выполнен подбор информации, анализ результатов, литературное

оформление, подготовка к печати). В статье нашли отражение основные положения главы 4.

Рационализаторские предложения:

1. Гринь, В.К. Спосіб отримання трансплантата лімбальних клітин на амніотичній оболонці / Гринь В.К., Попандопуло А.Г., Кавеліна Г.С. [та інш.] // Патент на корисну модель № 65506. А 61 F 9/00 Донецький національний медичний університет ім. М. Горького. Опублікован 12.12.2011, бюл. №23. (Лично соискателем выполнен подбор информации, культивирование клеток *in vitro*, анализ результатов, литературное оформление, подготовка к печати). В патенте на полезную модель нашли отражение основные положения главы 2.
2. Гринь, В.К. Спосіб отримання культивованих лімбальних клітин / Гринь В.К., Попандопуло А.Г., Кавеліна Г.С. [та інш.] // Патент на корисну модель № 65507. А 61 F 9/00/ Донецький національний медичний університет ім. М. Горького. Опублікован 12.12.2011, бюл. №23. (Лично соискателем выполнен подбор информации, культивирование клеток *in vitro*, анализ результатов, литературное оформление, подготовка к печати). В патенте на полезную модель нашли отражение основные положения главы 2.
3. Попандопуло, А.Г. Спосіб отримання моношару культивованих клітин рогівки на внутрішній поверхні м'яких контактних лінз / Попандопуло А.Г., Кавеліна Г.С., Іванова О.М., Дрожжина Г.І. // Патент на корисну модель №86892 A61F 9/00 Державна Установа «Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В.К.Гусака НАМН України». Опублікован 10.01.2014. Бюл. №1. (Лично соискателем выполнен подбор информации, культивирование клеток *in vitro*, анализ результатов, литературное оформление, подготовка к печати). В патенте на полезную модель нашли отражение основные положения главы 2.
4. Попандопуло, А.Г. Спосіб отримання культивованих лімбальних стовбурових клітин та клітин плоского епітелію рогівки на амніотичній оболонці / Попандопуло А.Г., Кавеліна Г.С., Іванова О.М., Дрожжина Г.І. // Патент на корисну модель №87174 A61F 9/00 Державна Установа «Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В. К. Гусака НАМН України». Опублікован 27.01.2014. Бюл. №2. (Лично соискателем выполнен подбор информации, культивирование клеток *in vitro*, анализ результатов, литературное оформление, подготовка к печати). В патенте на полезную модель нашли отражение основные положения главы 3.

**Список докладов конференций**

1. Вплив фізико-хімічних властивостей м'яких контактних лінз на адгезію і проліферацію клітинних ліній. Попандопуло А.Г., Кавеліна А.С., Оберемко А.В., Яковенко Т.А. Трансплантологія. Т. 10. № 1, 2008. С. 257–258.
2. Использование культивированных фетальных фибробластов в лечении тяжелого термохимического ожога лица, век и глазного яблока (клинический

- случай). Бережная М.С., Попандопуло А.Г., Сухина Л.А., Кавелина А.С. Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения 2009». С. 534–535.
3. Мягкие контактные линзы как подложка для культивирования фетальных фибробластов / Пасечникова Н.В., Иванова О.Н., Дрожжина Г.И. и др. Материалы XII съезда офтальмологов Украины. 2010. С.534.
4. Влияние культуры лимбальных эпителиальных клеток на процессы регенерации роговицы при экспериментальной нейротрофической кератопатии / Пасечникова Н.В., Иванова О.Н., Дрожжина Г.И., Вит В. В., Гайдамака Т.Б., Попандопуло А.Г., Кавелина А.С. Матеріали Науково-практичної конференції офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання». 2011. С. 29–30.
5. Культивирование эпителиальных лимбальных клеток роговицы человека на амниотической оболочке. Пасечникова Н.В., Попандопуло А.Г., Иванова О.Н., Кавелина А.С., Дрожжина Г.И. Матеріали Науково-практичної конференції офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання». 2012. С. 32-33.
6. Получение трехмерного транспланта лимбальных клеток роговицы. Пасечникова Н.В., Гринь В.К., Дрожжина Г.И., Попандопуло А.Г., Иванова О.Н., Кавелина А. С. Программа Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнології в клінічній медицині». 2012. Вестник неотложной и восстановительной медицины. Том 13, №1 2012. С. 99–102.
7. Влияние трансплантации монослоя стволовых клеток роговицы человека, культивированных на «амниотическом платексе», на регенерацию роговицы при инфекционных и дегенеративных заболеваниях. Пасечникова Н.В., Дрожжина Г.И., Вит В.В., Иванова О.Н., Гайдамака Т.Б., Попандопуло А.Г., Кавелина А.С. Матеріали Науково-практичної конференції офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання» присвяченої 80-річчю тканинної терапії за методом В.П. Філатова. - 2013. - С.40–41.
8. Клеточно-тканевой эквивалент роговицы. Попандопуло А.Г., Кавелина А.С., Иванова О.Н., Дрожжина Г.И. 1 Национальный конгресс по регенеративной медицине, материалы конгресса. - 2013. - С.208.
9. Efficiency of stem cell therapy on the model of neurotrophic keratitis (keratopathy). Ivanova O.N, Kavelina A.S., Drozhzhina G.I., Popandopulo A.G. Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE), 2013. POS – EP – COR – 218 – 66 Р.
10. Multi layer cultivation of cornea cells on the amnion surface. Kavelina A., Popandopulo A., Ivanova O., Drozhzhyna G. World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology WOC 2014 XXXIV International Congress of Ophthalmology, 29th Asia-Pasific Academy of Ophthalmology APAO 2014,118th Annual Meeting of the Japanese Ophthalmological Society. Travel Grants – WOC 2014. - PO-835.

11. Cultivation allogenous limbal epithelial stem cells of the human cornea to the inner surface of a soft contact lens. Ivanova O., Drozhzhina G., Popandopulo A., Kavelina A.]. – World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology WOC 2014 XXXIV International Congress of Ophthalmology, 29th Asia- Pasific Academy of Ophthalmology APAO 2014, 118th Annual Meeting of the Japanese Ophthalmological Society, 2014. FP-TH-01-6.

12. Создание трехмерного транспланта поверхностных слоев роговицы Кавелина А.С., Попандопуло А.Г., Прокопюк О.С., Савчук М.В. 39-я ежегодная конференция молодых ученых «Холод в биологии и медицине». Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015; 25(2):91-202, С.197.

## АННОТАЦИЯ

Кавелина А.С. «Патогенетическое обоснование создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека». - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 - патологическая физиология. Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака МЗ ДНР, г. Донецк, 2022.

Лимбальные стволовые клетки обладают основной характеристикой стволовых клеток, способностью к дифференцировке и пролиферации под влиянием расположенной рядом ниши с соответствующими лимбальными сосудами- палисадами Фогта. Для поддержания нормального функционирования лимбальных стволовых клеток необходим определенный баланс экстрацеллюлярного матрикса, растворимых биохимических медиаторов и вспомогательных клеток внутри ниши. Повреждение структуры ниши происходит при термических и химических ожогах, герпетических кератитах, трофических нарушениях роговицы, вторичной отечной дистрофии роговой оболочки, синдроме Стивена-Джонса и пемфигоид. Это приводит к помутнению и истощению лимбальных стволовых клеток, а впоследствии к аплазии. В результате развивается лимбальная недостаточность (ЛН). Среди синтетических и биологических субстратов для культивирования стволовых клеток амниотическую мембрану рассматривают как наиболее перспективный метод, влияющий на репаративный процесс. Показано, необходимость использовать амнион в качестве носителя культивированных клеток, так как она моделирует образ своеобразной ниши для стволовых клеток роговицы.

Серьезной проблемой является способность идентифицировать лимбальные стволовые клетки *in vitro*. Это исследование было проведено для оценки возможности культивировать на амниотической мембране лимбальные стволовые клетки и клетки плоского эпителия роговицы: на стромальной стороне и базальной стороне. А также экспрессии маркеров, ассоциированных со стволовыми клетками: ABCDG2, CD 117, P63, cytokeratin 3/12, cytokeratin 19, pan-cytokeratin, vimentin, EGFR, TGFRb3, Ki67, keratin sulfate. Гистология

подтвердила рост лимбальных стволовых клеток и клеток плоского эпителия роговицы с обеих сторон амниотической мембраны без морфологических различий.

Амниотическая мембрана является идеальным биологическим субстратом, обладает свойствами, которые способствуют росту лимбальных эпителиальных стволовых клеток.

## ABSTRACT

### **Kavelina A.S. Pathogenetic justification for the creation of a bioequivalent of the surface layers of the cornea of the human eye. – Manuscript.**

Dissertation for candidate of medical sciences in specialty 14.03.03 – pathological physiology. – Institute of Emergency and Reconstructive Surgery n. V. K. Gusak, MZ DPR, Donetsk.

Limbal stem cells have the main characteristic of stem cells, the ability to differentiate and proliferate under the influence of nearby niche corresponding limbal vessels, Vogt's palisades. To maintain the normal functioning of limbal stem cells, a certain balance of the extracellular matrix, soluble biochemical mediators, and support cells within the niche is required. Damage to the structure of the niche occurs with thermal and chemical burns, herpetic keratitis, trophic disorders of the cornea, secondary edematous degeneration of the cornea, Steven-Jones syndrome and pemphigoid. This leads to clouding and depletion of limbal stem cells, and subsequently to aplasia. As a result, limbal insufficiency develops (LI).

Among synthetic and biological substrate for stem cell cultivation, the amniotic membrane is considered as the most promising method affecting the reparative process. It is shown that it is necessary to use the amnion as a carrier of cultured cells, since it models the image of a kind of niche for corneal stem cells. A major challenge is the ability to identify limbal stem cells *in vitro*. This study was conducted to evaluate the feasibility of culturing limbal stem cells and corneal squamous epithelial cells on the amniotic membrane: on the stromal side and basal side. As well as the expression of markers associated with stem cells: ABCDG2, CD117, p63, cytokeratin 3/12, cytokeratin 19, pan-cytokeratin, vimentin, EGFR, TGFRb3, ki67, keratin sulfate. Histology confirmed limbal stem cell growth on both sides of AM, with no morphological differences.

AM is an ideal biological substrate that can help maintain and support the expansion of limbal epithelial stem cells.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**bFGF** – фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)

**HGF** – фактор роста гепатоцитов (Hepatocyte growth factor)

**IGF** – 1-инсулиноподобный фактор роста 1 (Insulin-like growth factor)

**IL 1 $\beta$**  – интерлейкин 1 $\beta$

**KGF** – фактор роста кератиноцитов (Keratinocyte growth factor)

**PBS** - фосфатно- буферный раствор (phosphate buffer solution)

**PDGF** – фактор роста тромбоцитов (Plateled-derived growth factor)

**TGF $\alpha$**  – трансформирующий фактор роста  $\alpha$  (Transforming growth factor alpha)

**TGF $\beta$ 1** – трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1 (Transforming growth factor  $\beta$ 1)

**TGF $\beta$ 2** – трансформирующий фактор роста  $\beta$ 2 (Transforming growth factor  $\beta$ 2)

**АМ** – амниотическая мембрана

**ВКМ** – внутриклеточный матрикс

**ДМСО** – диметилсульфоксид

**ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота

**ИГХ** – иммуногистохимия

**ИФА** – иммуноферментный анализ

**КПЭ** – клетки плоского эпителия

**ЛН** – лимбальная недостаточность

**ЛСК** – лимбальные стволовые клетки

**МАП** – митоген активируемой протеинкиназы

**МКЛ** - мягкие контактные линзы

**ММТ** - 3-4,5 methylthiazole-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

**МСК** - мезенхимальные стволовые клетки

**ОТ** – обратная транскрипция

**ПЦР** – полимеразная цепная реакция

**СК** – стволовые клетки

**ФК** – фетальные клетки

**ЭТС** - эмбриональная телячья сыворотка (FBS, Fetal Bovine Serum)