

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

На правах рукописи

КАВЕЛИНА

Анна Станиславовна

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

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Кравченко А.И.

Донецк–2023

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. РОЛЬ ЛИМБАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ В РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА	22
1.1. Патогенетические особенности возникновения синдрома лимбальной клеточной недостаточности.....	22
1.2. Лимбальные эпителиальные клетки как источник регенерации эпителия роговицы.....	28
1.3. Микроокружение и факторы, определяющие длительность существования лимбальных клеток.....	33
1.4. Современные методы применения лимбальных стволовых клеток при лечении дефектов роговицы различной этиологии.....	40
1.5. Анатомо-функциональные особенности биологических субстратов для применения лимбальных стволовых клеток.....	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	52
2.1. Получение и идентификация клеточных культур роговицы.....	52
2.1.1. Выделение и культивирование лимбальных клеток и клеток плоского эпителия роговицы глаза человека.....	53
2.1.2. Идентификация клеточных линий	56
2.1.3. Оценка функциональных свойств	61
2.2. Культивирование на поверхности амниотической мембраны	64
2.2.1. Методика создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека	64
2.2.2. Идентификация биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека	68
2.2.3. Оценка функциональных свойств.....	70
2.3. Методы статистической обработки полученных данных.....	71
ГЛАВА 3. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ	72

3.1. Морфофункциональное состояние лимбальных стволовых клеток роговицы.....	72
3.2. Морфофункциональное состояние клеток плоского эпителия роговицы глаза человека	82
3.3. Морфофункциональное состояние амниотической мембраны.....	85
ГЛАВА 4. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ НА ПОВЕРХНОСТИ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ.....	90
4.1. Морфофункциональное состояние лимбальных стволовых клеток роговицы на стромальной стороне амниотической мембраны.....	90
4.2. Морфофункциональное состояние клеток плоского эпителия роговицы на стромальной стороне амниотической мембраны.....	93
4.3. Морфофункциональное состояние лимбальных стволовых клеток роговицы на базальной стороне амниотической мембраны	94
4.4. Морфофункциональное состояние клеток плоского эпителия роговицы на базальной стороне амниотической мембраны	95
4.5. Криоконсервирование лимбальных стволовых клеток и клеток плоского эпителия роговицы на поверхности амниотической мембраны	100
4.6. Оценка функционального состояния послойного культивирования лимбальных стволовых клеток и клеток плоского эпителия роговицы на стромальной стороне и базальной стороне амниотической мембраны.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	106
ВЫВОДЫ.....	121
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125

ВВЕДЕНИЕ

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 достаточно важной и актуальной проблемой офтальмохирургии [29, 58, 87, 100].

За последнее время в Российской Федерации выявлено более 450 тысяч слабовидящих и слепых, из них пациенты с патологией роговицы составляют 18% [36, 38, 54].

Эпителиальные стволовые клетки поддерживают нормальную поверхность эпителия роговицы и её прозрачность. Лимбальные стволовые клетки (ЛСК) представляют популяцию низкодифференцированных клеток эпителия лимбальной зоны, препятствуют инвазии конъюнктивального эпителия на поверхность роговицы [164].

ЛСК обладают основной характеристикой стволовых клеток, способностью к дифференцировке и пролиферации под влиянием расположенной рядом среды с соответствующими лимбальными сосудами - так называемой ниши [176]. Нишами для ЛСК служат палисады Фогта [146]. Для поддержания нормального функционирования ЛСК необходим определенный баланс экстрацеллюлярного матрикса, растворимых биохимических медиаторов и вспомогательных клеток внутри ниши [170]. Повреждение структуры ниши происходит при различных заболеваниях, а именно: термические и химические ожоги [60]; герпетические кератиты [8, 21, 59]; трофические нарушения роговицы [55]; вторичная отёчная дистрофия роговой оболочки [23, 43] заболевания, связанные с иммунной системой (синдром Стивена-Джонса); пемфигоид [93]. Все перечисленное приводит к помутнению и истощению ЛСК, а в последствии к аплазии, в результате чего 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 [128].

Несвоевременное применение хирургических методов лечения может являться причиной осложненного лечения и неблагоприятного исхода воспалительного процесса [57]. По данным разных источников существует риск осложнений, приводящих к потере зрения и гибели глаза, что составляет 35-65% всех случаев [51, 138].

Лечение помутнений роговицы является сложной многоплановой работой [13].

Эффективным хирургическим методом лечения поврежденной роговицы является выполнение кератопластики [1, 136]. Однако ограниченное количество донорского материала снижает возможное её применение [19].

В основе лечения воспалительного заболевания роговицы лежит применение антибиотиков и противовоспалительных средств. Для улучшения доставки лекарственных средств к пораженным структурам роговицы используют плёнки на основе коллагена и мягкие контактные линзы (МКЛ). В качестве биологических покрытий применяют различные ткани: кадаверная роговица [25], амниотическая оболочка [157], синтетические материалы и т.д. [134]. С целью угнетения воспаления и ограниченности рубцевания используют местные глюкокортикостероиды. В острую фазу острого кератита они противопоказаны, а неадекватное их использование может привести к микробному росту [44, 142].

Для ограничения изъятия стромы роговицы и закрытия микроперфораций используют адгезивный тканевой клей «цианоакрилат». На синтетическую пластину наносят клей, в дальнейшем помещают на область истончения или перфорацию и покрывают контактной линзой. Для закрытия прогрессирующей язвы используют конъюнктивальный лоскут, но вероятность восстановления зрения достаточно низкая [202].

Рассматривают комбинированное применение биополимера гиалуроната натрия с плазмой, обогащенной тромбоцитами. Проведены исследования пролиферации и миграции *in vitro* в клетках эпителия роговицы человека и в первичных эпителиальных культурах роговицы кролика. По мнению

исследователей, комбинированное применение *in vivo* оказывает худший эффект. При оценке результатов необходимо проводить тесты с различными молекулярными массами и концентрациями гиалуроната натрия [198].

В 2015г. Michele De Luca и Graziella Pellegrini был зарегистрирован единственный офтальмологический биомедицинский продукт «Holoclar» коммерческой компании Holostem Terapie Avanzate S.R.L. «Holoclar» состоит из круглой подложки фибрина с культивированными аутологичными эпителиальными клетками лимба роговицы, находящимися в питательной среде. Клеточность составляет 79000-316000 клеток /см², в их числе ЛСК составляют 3,5% (экспрессия p63 от 0,4 до 10%), а также ТА-амплифицирующие клетки и терминально дифференцированные клетки, происходящие из стволовых.

В Российской Федерации ведутся разработки по созданию клеточных препаратов для регенерации роговицы. Федеральный закон №180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» принят 23 июня 2016 г. Биомедицинский клеточный продукт состоит из клеточной линии и дополнительных веществ, прошедших государственную регистрацию лекарственными препаратами для медицинского применения.

Министерством Здравоохранения РФ одобрено клинические применения пересадочного материала «Аллоплант» (рег. удостов. №901 от 22.07.87). «Аллоплант» нашел широкое применение не только в офтальмологии, но и в пластической хирургии, нейрохирургии, стоматологии и других областях медицины.

Важное значение имеют препараты, ускоряющие регенерацию эпителия роговицы, что приводит исследователей к поиску эффективных и безопасных средств.

Клеточная терапия – одно из новых научных направлений регенеративной медицины, интенсивно развивающееся в последние десятилетия, основными требованиями которой являются безопасное использование алло- и аутологичных живых клеток. В клинической практике находят применение методы для лечения патологических состояний роговицы глаза человека,

используя собственные ресурсы организма – «стволовые клетки». Стволовые клетки (СК) обладают уникальными свойствами самообновления и возможностью дифференцироваться в специфические виды клеток, что является основанием для их применения в регенерации поврежденного роговичного эпителия.

При химическом ожоге или рубцующемся конъюнктивите применяют трансплантацию ЛСК. Источником донорской ткани может быть здоровый парный глаз пациента (ауто трансплантант) при односторонней патологии, при двустороннем процессе – глаз другого человека или кадаверный глаз (аллотрансплантант).

По результатам исследований Nakamura T. и Kinoshita S. (2003г.) для пациентов с тяжелыми двусторонними проявлениями ЛН применяют монослой культивированных буккальных эпителиоцитов, схожих по строению с нормальным эпителием роговицы [73].

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 [34].

Проведены экспериментальные исследования Di Girolano et al. *in vitro* и *in vivo* по применению силикон-гидрогелевых контактных линз в качестве подложки для культивирования ЛСК. В процессе наблюдали адгезию, пролиферацию и миграцию ЛСК с образованием монослоя. Возможность применения линз с такими свойствами была применена в клинике с положительным результатом для уменьшения симптомов ЛН и улучшения остроты зрения [96].

В настоящее время широкое применение в реконструкции последствий повреждений глаза получила амниотическая мембрана (АМ) [7]. Амнион является самым внутренним слоем зародышевых оболочек человека. Содержащиеся 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.

Впервые амниотическую оболочку в кожной трансплантологии применили в 1910 году. В 40-х годах прошлого века амнион стали использовать в офтальмологии. Учитывая рекомендации ВОЗ, применение АМ в качестве ткани в Российской Федерации регламентировано законом №4180 от 22.12.1992 г. «О трансплантации органов и (или) тканей человека». Согласно которому определяется порядок и условия трансплантации органов и (или) тканей, основываясь на современных достижениях медицинской науки и практики. В офтальмологических клиниках используют нативную, консервированную, криоконсервированную, силико-высушенную, лиофилизированную АМ.

Среди многочисленных предложенных методов для консервации тканей отдельное место занимает лиофилизация. Метод заключается в высушивании предварительно замороженной ткани для дальнейшего хранения с последующим использованием в клинической практике. В офтальмологии разрешены к применению и используются: лиофилизированная твердая мозговая оболочка для склеропластических операций (регистрационный №623 от 03.12.1996г., лицензия В167373), лиофилизированная кадаверная роговица для послойной кератопластики (авт. свидетельства 5037564 от 14.04.1992 г., 5038677 от 28.05.1992), силиковысушенная амниотическая оболочка (патент РФ 2214091 С1 от 09.04.1992г.). Исследования доказывают, что лиофилизация сохраняет пластические и трансплантационные свойства тканей, не требует применения химических консервантов, изменяющих их биохимический состав. Лيوфилизированные трансплантаты могут длительно храниться при комнатной температуре (до 5 лет), не требуют особых условий, легко транспортируются [56]. Недостатками лиофилизации является тщательная подготовка препарата к процессу высушивания и высокие энергетические затраты.

Проведен анализ ряда результатов исследований по поводу правильного расположения амниотической оболочки как биопокрытия на поверхности роговицы. Офтальмологи описывают, что не существует стандартной техники

трансплантации амниона [97]. Оболочка может быть фиксирована базальным эпителием или стромальной стороной амниона, обращенным вверх к глазу [49].

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 [213]. Криоконсервация является единственным известным методом, способным обеспечить длительную сохранность жизнеспособных клеток, а также матриц [147].

Процесс криоконсервирования сохраняет морфологические и метаболические свойства клеток, предотвращая их гибель. Процедура замораживания-оттаивания клеточных культур является наиболее повреждающим этапом.

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 предопределил исход осложнений.

Степень разработанности темы. 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. Частичное или полное повреждение популяции лимбальных стволовых клеток приводит к возникновению персистирующих эпителиальных дефектов, в дальнейшем к конъюнктивализации роговицы. Ввиду недостатка тканевых трансплантаций,

исследователями [30] ведётся поиск биологических и синтетических матриц по заданным параметрам. 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, фиброин шёлка, поликаполактон, полилактид-ко-гликолид [104]. Однако получено недостаточное количество результатов *in vitro*, в следствие чего возникает необходимость продолжения экспериментальных и соответствующих клинических исследований.

Имеются данные об эффективном использовании перилимбальной трансплантации амниона в комплексе с кератостромэктомией при тяжёлых формах эпителиально-эндотелиальной дистрофии роговицы [48].

Авторы применяют амнион при эрозиях и изъявлениях роговицы как биологическую повязку, при конъюнктивальной пластике – как пластический материал. При патологии поверхности роговицы, вызванной ЛН после ожога, применяют лимбальные клетки, культивированные на АМ [15]. Амнион оказывает выраженный противовоспалительный и анальгезирующий эффект, защищает от бактериальной инфекции, способствует процессу эпителизации и ингибирует васкуляризацию стромы [132]. Небольшой срок хранения нативного амниона является недостатком метода [145]. Использование криоконсервированных материалов при длительном хранении, даёт такие же результаты, как применение нативного.

Для лечения ожогов и эпителизации дефектов роговицы Тлеубаевым К.А. [52] предложена биоконструкция «коллаген с культивированными ростковыми клетками лимба», фиксированные на АМ. По данным автора, после консервации в течении нескольких месяцев количество жизнеспособных клеток человека составляет 86%, свиных 96%.

Культивированные ЛСК широко применяются во всех офтальмологических клиниках по всему миру [188]. Трансплантация АМ внесла существенный вклад в лечение состояний, вызванных дефицитом стволовых клеток лимба, приводящим к потере зрения. Амнион обладает свойствами, способствующими росту эпителизации, контролирует процесс воспаления и рубцевания и одновременно является своеобразной нишей 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 человека.

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

Научная новизна работы:

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 мембране 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.
2. С помощью разработанных методов проведена идентификация культивированных ЛСК и КПЭ роговицы человека в монокультуре и в составе многослойного культивирования.
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 действием 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: культивирования *in vitro*; программного замораживания; иммуногистохимии; 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 монослойном 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 апробация результатов исследования.

Степень достоверности результатов проведённых 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 «Инновационные 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 автора в проведенное исследование. Диссертация является самостоятельным научным трудом соискателя. Автором самостоятельно разработан дизайн и программа исследования. Проявлено непосредственное участие в сборе данных в проведении экспериментов, включённых 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.

Публикации материалов исследований. По теме диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных перечнем Высшей аттестационной комиссии (из них 2 – без соавторов), оформлено 4 патента на полезную модель, 11 тезисов в материалах научных конференций.

Структура и объём диссертации.

Диссертация изложена на 151 странице машинописного текста (123 страницы основного текста, 28 страниц списка литературы) и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, 4 главы, анализ и обобщение результатов исследований, заключение, выводы и практические рекомендации. Диссертация иллюстрирована 74 рисунками, 5 таблицами, 2 схемами. Список литературы включает в себя 224 библиографических наименования (60 отечественных и 164 зарубежных авторов).

Список публикаций по теме работы:

Статьи в рецензируемых изданиях

1. Сухина, Л.А. Случай применения культивированных фетальных фибробластов в лечении тяжёлого термохимического ожога лица, век и глазного яблока / Л.А. Сухина Л.А., М.С. Бережная, А.Г. Попандопуло, А.С. **Кавелина** // Вісник невідкладної і відновної медицини. Науково–практичний журнал. – 2009. - Том 10, №1. - С. 133–135.
2. 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.
3. Попандопуло А.Г. Роль лимбальных клеток в регенерации роговицы /Попандопуло А.Г., **Кавелина А С.**, Иванова О.Н. [и др.] // Науково-практичний журнал Таврійський медико- біологічний вісник. - 2013. – Т.16, №1, ч.2, (61). - С.158-160.
4. Пасечникова, Н.В. Получение трёхмерного трансплантата 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.

5. **Кавелина, А.С.** Культивирование адгезивных клеточных культур на мягких контактных линзах /А.С. Кавелина // «Весник» Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина. Серия: биология. 2014. - №1126. Выпуск 22. – С.8–15.
6. **Kavelina, A.S.** Creation of cornea biograp / A.S. Kavelina //The Joraul of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: biology. 2014. - Issue 21. - №1112. - P.7-12.
7. **Кавелина, А.С.** Влияние ориентации криоконсервированной амниотической мембраны 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.
8. **Кавелина, А.С.** Влияние криоконсервации на морфологию культивируемых клеток роговицы глаза человека на амниотической мембране /А.С. Кавелина, А.Г. Попандопуло, А.И. Кравченко // Актуальные проблемы экологической и клинической биохимии. – 2022. - №4(172). – С.228-234.

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.
2. **Гринь, В.К.** Спосіб отримання культивованих лімбальних клітин /В.К.Гринь, А.Г. Попандопуло, **Г.С. Кавеліна** [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.
3. **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 А61F 9/00 Державна Установа «Інститут невідкладної

та відновної хірургії ім.В.К.Гусака НАМН України». Оpubлiкован 27.01.2014. Бюл. №2.

4. Попандопуло, А.Г. Спосiб отримання моношару культивованих клiтин рогiвки на внутрiшній поверхні м'яких контактних лiнз / А.Г. Попандопуло, Г.С. Кавелiна, О.М. Иванова, Г.І. Дрожжина // Патент на корисну модель №86892 А61F 9/00 Державна Установа «Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В. К. Гусака НАМН України». Оpubлiкован 10.01.2014. Бюл. №1.

Список докладов конференций

1. Вплив фізико–хімічних властивостей м'яких контактних лiнз на адгезію і проліферацію клiтинних лiній / Попандопуло А.Г., Кавелiна А.С., Оберемко А.В., Яковенко Т.А. // Трансплантологія. Т. 10. № 1. - 2008. – С. 257–258.

2. Использование культивированных фетальных фибробластов в лечении тяжёлого 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 трёхмерного трансплантата 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». - 2012. - Вестник неотложной и восстановительной медицины. Том 13, №1. - 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». - 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), abstracts. - 2013. – POS – EP – COR – 218 – 66 P.

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. Final program. Travel Grants. – WOC 2014. PO-835.

11. Cultivation allogeneous 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-Pacific Academy of Ophthalmology APAO 2014. - 118th Annual Meeting of the Japanese Ophthalmological Society. - 2014. –FP-TH-01-6

12. Создание трёхмерного трансплантата 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». Научный журнал «Проблемы криобиологии и криомедицины». – 2015. – Vol.25(2). – P.197.

Список тезисов конференций:

1. Пасечникова, Н.В. Мягкие контактные линзы как подложка для культивирования фетальных фибробластов / Н.В. Пасечникова, О.Н. Иванова, Г.И. Дрожжина, В.В.Вит, А.С. Кавелина // Материалы XII съезда офтальмологов Украины. – 2010 г. – С.534.
2. Пасечникова, Н.В. Культивирование эпителиальных лимбальных клеток роговицы человека на амниотической оболочке / Н.В. Пасечникова, А.Г. Попандопуло, О.Н. Иванова, А.С. Кавелина, Г.И. Дрожжина // Матеріали Науково-практичної конференції офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання». – 2012. – С. 32-33.
3. Ivanova, O. Identified culture of limbal stem cells of the human cornea /O. Ivanova, G. Drozhzhina, A. Popandopulo, A. Kavelina // WOC2012. Aby Dhabi. – PO-TEC-06.
4. Попандопуло, А.Г. Платекс амниотический как субстрат для культивирования лимбальных эпителиальных стволовых клеток роговицы человека /А.Г. Попандопуло, А.С. Кавелина, О.Н. Иванова, Г.И. Дрожжина // Журнал НАМН України. – 2012. – Т.18. – С.134-135.
5. Попандопуло, А.Г. Морфологические аспекты культивирования лимбальных клеток на амнионе / А.Г. Попандопуло, А.С. Кавелина, О.Н. Иванова, Г.И. Дрожжина, В.К. Гринь, Н.В. // VI Ежегодный симпозиум

«Актуальные вопросы генных и клеточных технологий», журнал «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия». – 2013. – Т.VIII, №3. – С.45–46.

6. Кавелина, А.С. Перспективы биотехнологий в создании искусственной роговицы / А.С. Кавелина // «Инновационные технологии в повседневной офтальмологической практике», материалы офтальмологического конгресса с международным участием, приуроченного к 80-летию Казанского НИИ глазных болезней. – 2013г. – С.119-121.

7. Kavelina, A. Multi layer cultivation of cornea cells on the amnion surface / A. Kavelina, A. Popandopulo, O. Ivanova, G. Drozhzhyna // WOC 2014. E-poster. PO-835. Travel Grants.

8. Кавелина, А.С. Биоинженерная конструкция эквивалента роговицы и перспективы применения в клинической офтальмологии / А.С. Кавелина, А.Г. Попандопуло, О.Н. Иванова, Г.И. Дрожжина // XIII з'їзд офтальмологів України. – 2014 р. – С. 21-22.

9. Попандопуло, А.Г. Биотехнологии в регенерации роговицы / А.Г. Попандопуло, А.С. Кавелина // 2 Национальный конгресс по регенеративной медицине. – 2015 г. – С.77.

10. Кавелина, А.С. Создание трехмерного трансплантата поверхностных слоев клеток роговицы / А.С. Кавелина, А.Г. Попандопуло, О.С. Прокопюк, М.В. Савчук // 39-я ежегодная конференция молодых ученых «Холод в биологии и медицине». Тезисы конференции в журнале «Проблемы криобиологии и криомедицины». – 2015, 25(2):91-202. – С.197.

11. Кавелина, А.С. Клеточные технологии в реконструкции роговицы / А.С. Кавелина, А.Г. Попандопуло // Материалы II Международного медицинского форума Донбасса «Наука побеждать...болезнь». – 2018г. – С.88.

ГЛАВА 1. РОЛЬ ЛИМБАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ В РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

1.1 Патогенетические особенности возникновения синдрома лимбальной клеточной недостаточности

Роговичный и конъюнктивальный эпителий формируют здоровую поверхность глаза. Передний поверхностный эпителий является одной из значимых структур, обеспечивающих гомеостаз роговицы и глаза в целом. Многими исследователями доказано, что особое значение в регенерации поврежденного роговичного эпителия принадлежит зоне лимба. Работы Schermer и соавт. и ряд других исследователей подтверждают предположения о том, что лимбальный эпителий отвечает за регенерацию роговицы на протяжении всей жизни [149]. ЛСК и/или стромальное микроокружение, в котором они находятся, могут быть повреждены большим количеством факторов, вызывающих ЛН (схема 1). Патогенез заболевания обусловлен дефицитом стволовых лимбальных клеток, вследствие деструкции их стромы и постепенным заселением роговицы конъюнктивальным эпителием. ЛН протекает по типу медленно прогрессирующего заболевания. Наиболее частыми причинами возникновения являются вирусные инфекции, наследственные дистрофии роговицы, последствия химических ожогов, травм и прочее.

Клинические проявления дефицита клеточной недостаточности приводят к патологической конъюнктивно-корнеальной регенерации с периферической неоваскуляризацией. Характерно наличие хронического дефекта эпителия, проявляющегося стромальным воспалением и конъюнктивизацией роговицы. В результате этого развивается помутнение роговицы, появляется васкуляризация, снижается острота зрения, нарушается процесс эпителизации. Данное состояние в литературе обозначают также как конъюнктивизация роговицы, описано S.Tseng в 1989 г., и называют лимбальная клеточная недостаточность Limbal Stem Cell Deficiency (LSCD) [127] – ЛН [204].

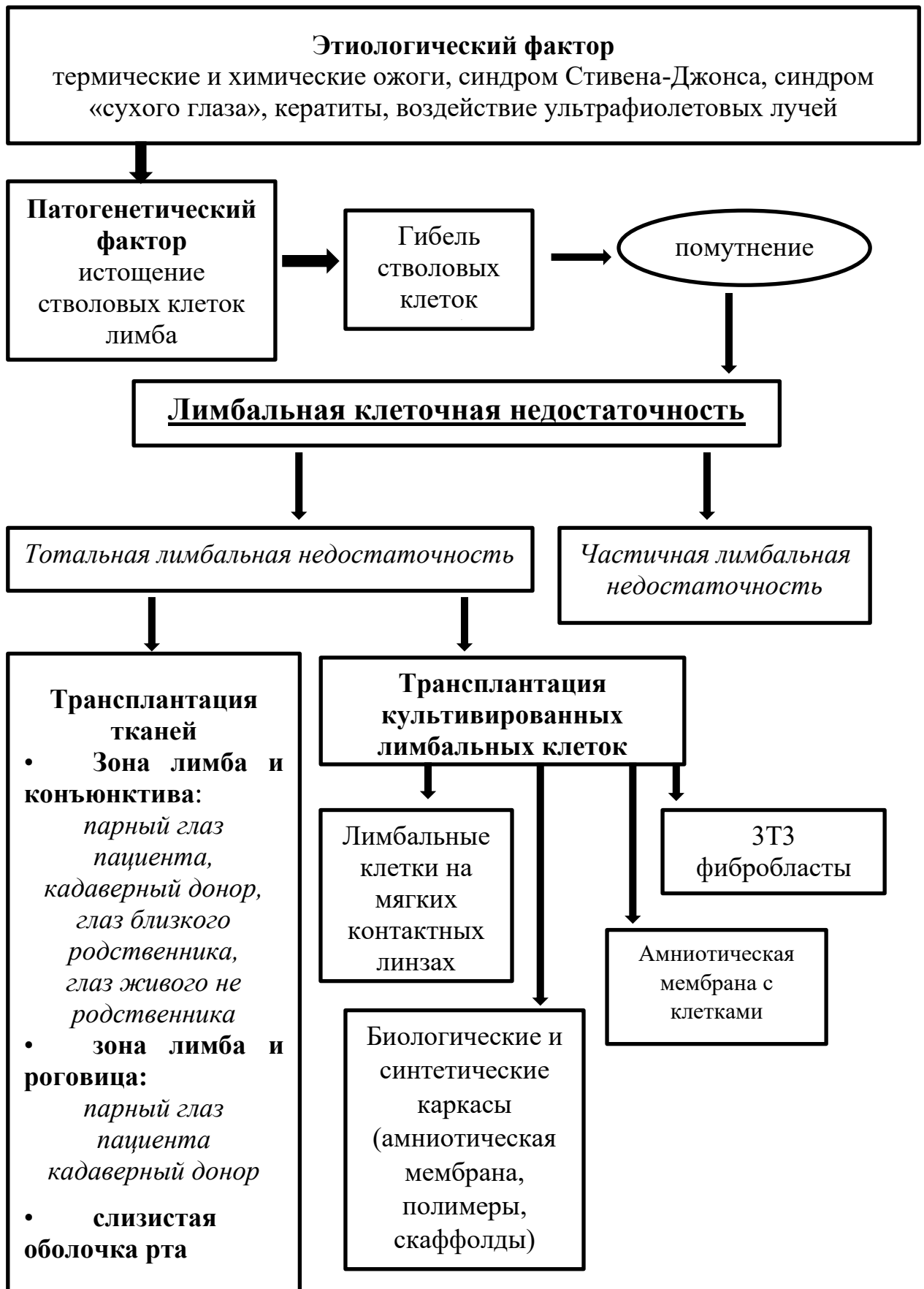


Схема 1 - патогенетическая схема синдрома лимбальной недостаточности.

Различают 2 категории ЛН:

- первичное повреждение СК лимбальной зоны
- первичное повреждение микроокружения СК ниши.

Патологические процессы, развивающиеся при нарушении целостности и соразмерности регенераторных процессов эпителиального слоя многообразны и могут быть обусловлены ожогами, хирургическими вмешательствами, синдромом Стивена-Джонсона, синдромом «сухого глаза», различными кератитами, повреждениями зоны лимба [167, 219]. Наиболее частым проявлением патологии эпителиального покрова роговицы глаза является птеригиум, ложный птеригиум, симблефарон, эпителиальные дистрофии роговицы.

Кератиты разделяют по патогенетическому принципу: нейротрофические, микробные, на фоне аутоиммунных заболеваний и т.д. [77, 208]. С практической точки зрения важным представляется определение первоначальной степени тяжести заболевания, а также обнаружение возможных факторов риска возникновения осложнений с целью установления оптимальной тактики лечения: только медикаментозное или в сочетании с хирургическим. Оценивается степень тяжести процесса, возможность развития осложнений самого кератита и факторы риска [5, 17, 159, 162].

По мнению многих авторов, в подобных случаях традиционное лечение не дает успешных результатов [185].

По последним литературным данным ЛН принадлежит одна из главных ролей в патогенезе продолжительно незаживающих ожоговых дефектов роговицы [64], представляющая достаточно тяжелую патологию. Ожоги глаз могут проявляться в результате различных геофизических, геологических, гидрологических явлений: пожары, заморозки, землетрясения, последствия аварий, военных действий, что приводит к комбинированному характеру поражения [2, 182, 195]. При ожогах в зависимости от глубины проникновения агента повреждения в ткани глаза повреждается роговичный и

конъюнктивальный эпителий, строма, эндотелий роговицы, нервные окончания, радужка и т.д. В результате повреждения нервных рецепторов в коже век, конъюнктиве и роговице их чувствительность на поврежденных участках снижается или отсутствует. Состояние глаз при ожогах характеризуется истощением собственных СК лимба и приводит к дегенерации роговицы с характерным роговичным синдромом [175]. При выраженном роговичном синдроме нарушается миграция и пролиферация СК лимбальной зоны, что нарушает нормальное восстановление дефекта роговицы [110].

Для традиционного лечения характерно проведение противовоспалительной, дезинтоксикационной, стимулирующей терапии, профилактических мероприятий по борьбе с инфекционными осложнениями, что не всегда приносит результат [10]. Нарушение регенераторно-репаративных процессов происходит вследствие воздействия биохимических и физиологических изменений при ожогах роговицы. Это проявляется в возникновении рецидивирующих эрозий и незаживающих язв роговицы, что впоследствии приводит к интенсивно васкуляризованным бельмам.

В развивающейся офтальмохирургии при лечении дегенерации роговицы такого рода для достижения лечебного и функционального результата преимущество отводится кератопластике. Но, к сожалению, при кератопластике достичь желаемого результата удастся не всегда. В послеоперационный период часто отмечается пониженная регенеративная способность, замедляется приживание трансплантата, что приводит к иммунологическому конфликту и нарушению микроциркуляции собственной поврежденной ткани. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что даже при наличии многообразия используемых терапевтических и хирургических приемов лечения, эффективной, стабильной эпителизации достичь не удастся.

Для восстановления постоянного эпителиального слоя роговицы глаза существует две основные хирургические методики, предложенные Holland E. и Schwarz G. в 1996 г. [108]: первая заключается в пересадке тканей, вторая – основана на трансплантации культивированных эпителиальных клеток. Позднее

Daya S., с соавт. в 2011г. внес изменения в классификацию «Cornea Society Nomenclature for Ocular Surface Rehabilitative Procedures» [91].

В тканевой трансплантации Thoft R. в 1984 г. впервые осуществил успешную лимбальную трансплантацию эпителия роговицы, взятую с кадаверного донора при периферической язве роговицы [140].

Аутологичная трансплантация впервые проведена в 1989 г. Kenyon K. и Tseng S. при лечении односторонней ЛН. Операция была успешна из-за отсутствия отторжения трансплантата [82].

Для лечения двусторонней ЛН в 1994 г. предложен способ аллогенной керато- лимбальной трансплантации, в качестве донора использовали кадаверную роговицу [84]. Позднее, в 1996 г., провели успешную аллотрансплантацию лимбально-конъюнктивального лоскута от живого родственника. Метод невозможно применять при отсутствии близких родственников у пациента.

Наиболее актуальным при тканевых трансплантациях является предложенный в 2011 г. способ [83], сочетающий метод трансплантации керато- лимбального аллогенного лоскута и аллогенного конъюнктивального лоскута от близкого родственника пациента.

По мнению авторов, к данному времени предложено множество методов и способов тканевых трансплантаций, но у всех есть недостатки: аутоотрансплантация несет риск развития на здоровом глазу ятрогенной ЛН, аллотрансплантация может привести к отторжению трансплантата, не исключены рецидивы конъюнктивализации роговицы [15]. По мнению некоторых исследователей, в течение нескольких лет половина проведенных аллогенных трансплантаций оказывается несостоятельной, а доля отторжения трансплантата составляет более 60%.

В трансплантации культивированных эпителиальных клетках основным моментом является использование предельно малого количества клеточного материала без видимого повреждения зоны лимба, использование питательных сред и факторов роста на оптимальном носителе для культивирования клеток.

Способ культивирования эпидермальных кератиноцитов был предложен в 1975г. Rheinwald J.G. [98], позднее исследователи экспериментально доказали, что для культивирования СК необходимо наличие фибробластов для длительной пролиферации клеток, а также определенное количество ростовых факторов и цитокинов [163].

Для выращивания эпителиальных клеток роговицы человека впервые применили в 1997 г. 3Т3 фидерные клетки, другими словами «питающие» фибробласты [181]. Но из-за возможной передачи пациенту зоонозной инфекции в дальнейшем использовать материал животного происхождения отказались и заменили на человеческие фидерные клетки: мезенхимальные стволовые клетки, клетки жировой ткани, дермальные фибробласты и т.д [129, 131, 160].

Аутологичная трансплантация лимбальных эпителиальных клеток эффективна при односторонней ЛН. Исследователи наблюдали, что трансплантируемые клетки сохраняли работоспособность сроком до 10 лет [117, 186]. При тяжелых двусторонних поражениях глазной поверхности успешно применение кадаверных ЛСК, что не исключает рецидива конъюнктивализации роговицы.

Как альтернативный источник камбиальных эпителиальных клеток рассматривают буккальный эпителий полости рта [113]. Исследования, выполненные в 2003г. Nakamura и Kinoshita, свидетельствуют о возможности применения в клинике культивированных аутологичных буккальных эпителиальных клеток при лечении двусторонней ЛН [210].

Много исследований направлено на поиск субстрата для культивирования ЛСК, который отвечал всем требованиям офтальмохирургов. Прозрачность, биосовместимость, отсутствие иммуногенных свойств необходимы для биологического или синтетического каркаса.

Поиск оптимальных субстратов начат в 1982 г., когда успешно провели исследование на обнаженной строме роговицы кроликов [77].

Успешное применение в 2000г. аутотрансплантации ЛСК на нативной АМ, позднее подтвердило, что на деэпителизированной АМ эпителиальные клетки лимба быстрее формируют монослой [203, 209].

Открываются широкие возможности для экспериментальных исследований по разработке альтернативных подложек для культивированных ЛСК. Перспективными считают коллагенные скафолды [169], кератиновые пленки [214], гидрогель хитозана [111], мягкие контактные линзы [96], нановолокна [172], 3D-каркасы [166].

Таким образом, среди предложенного многообразия синтетических и биологических субстратов для культивирования стволовых клеток АМ рассматривают как наиболее перспективный метод, влияющий на репаративный процесс [156, 218, 222]. В многочисленных работах показывают необходимость использовать амнион в качестве носителя культивированных клеток, так как он моделирует образ своеобразной ниши для стволовых клеток роговицы. Важным преимуществом метода являются анатомо–функциональные особенности АМ, что подтверждают иммуногистохимические исследования [79, 130].

1.2. Лимбальные эпителиальные клетки как источник регенерации эпителия роговицы

Роговица состоит из 5 слоев: эпителий, Боуменова мембрана, строма, Десцеметова мембрана, эндотелий.

- Эпителий имеет толщину около 40-50 мкм, состоит из 5-7 слоев неороговевающих клеток плоского эпителия. Базальная мембрана состоит из коллагена IV типа, ламинина и нидогена. Эпителий состоит из поверхностных, крыловидных и базальных клеток. За счет плотных контактов между собой поверхностные клетки препятствуют проникновению в эпителий токсинов, микроорганизмов и слез. Базальные клетки дифференцируются в крыловидные и поверхностные эпителиальные клетки по мере их миграции к поверхности

[109]. Эпителий обновляется за счет центростремительной миграции, начиная с лимба, где находятся эпителиальные стволовые клетки. СК асимметрично делятся на транзиторные амплифицирующие клетки, которые мигрируют, формируя базальный клеточный слой центральной части роговицы [179].

- Боуменова мембрана представляет собой бесклеточный слой, состоящий из коллагена типов I, III, IV, V, VI, VII, XII. Коллаген образуют соединяющееся между собой фибриллы (диаметр фибрилл 20-25 мкм). Толщина образованного слоя 8-12 мкм. Мембрана в случае повреждения или травмы не регенерирует, что в последствие приводит к рубцеванию. Предполагается, что функция мембраны состоит в защите субэпителиального нервного сплетения, проходящего через переднюю камеру [215].

- Строма составляет 80-90% толщины роговицы, обеспечивает основную структурную поддержку и свойства, такие как прозрачность, стабильность и прочность на растяжение. Состоит из фибрилл коллагена типов I, III, V, VI, XII и XIV, содержит кератансульфат и хондроитинсульфат, что обеспечивает прозрачность и гидратацию роговицы [65]. Строма содержит 250-300 гетерогенно организованных пластинок коллагена, среди которых располагаются кератоциты, занимающие 20% стромы. Кератоциты вырабатывают коллаген и протеогликаны для стабильности стромального каркаса и регуляции внеклеточного матрикса, способствующие процессу заживления [107].

- Десцеметова мембрана представляет собой базальный слой, который непрерывно секретируется эндотелиальными клетками роговицы и поддерживает структуру эндотелия. С возрастом размер мембраны увеличивается до 10 мкм. В структуре содержатся фибриллы коллагена типов III, V, IV и VII, фибронектин и ламинины. В качестве базальной мембраны эндотелия участвует в обезвоживании роговицы [80, 81].

- Эндотелий роговицы состоит из слоя гексагональных клеток толщиной 5 мкм, находится в непосредственном контакте с водянистой влагой. Диаметр

эндотелиальных клеток 20 мкм, имеют латеральные щели и плотные соединения, с их помощью крепятся полудесмосомами к десцеметовой мембране, не регенерируют *in vivo* из-за отсутствия митозов [101]. Замена поврежденных эндотелиальных клеток обеспечивается центростремительной миграцией периферических клеток эндотелия.

Поверхность глаза при нормальных условиях покрывает роговичный, лимбальный и конъюнктивальный эпителий. Характерные свойства роговичного эпителия отличают его от клеток других типов покровного эпителия [86]. Представляя собой уникальный источник регенерации и в нормальных условиях, и при заболеваниях, и травмах популяция СК обеспечивает постоянное поддержание эпителиальной структуры. Способность к неограниченному и продолжительному размножению определяет свойства стволовых клеток [105,150].

M.Davanger и A.Evansen в 1971 г. предположили, что эпителий лимба является источником СК для роговицы, что в дальнейшем было экспериментально и клинически подтверждено [94, 117, 193].

Лимб роговицы представляет собой полупрозрачное кольцо шириной до 1 мм и находится между прозрачной роговицей с переходом на склеру. В зоне лимба находятся фиброваскулярные складки, так называемые палисады Фогта, где расположены ЛСК.

Эпителий роговицы прозрачный, представлен плоским, многослойным эпителием и расположен на строме из высокоорганизованных коллагеновых фибрилл, под которым находится слой эндотелия [190]. Слой лишен бокаловидных клеток, удален от капиллярной сети, ближайшая расположена в лимбе, которая представляет собой узкое кольцо ткани в переходной зоне между роговицей и конъюнктивой [148]. Именно эта лимбальная область была идентифицирована как место, где находится популяция СК роговицы [63]. Средний размер лимбальных базальных эпителиальных клеток составляет $10,1 \pm 0,8$ мкм, это значительно меньше чем $19,9 \pm 1,6$ мкм поверхностных клеток

($p < \text{парный } t\text{-критерий}$). Считается, что взрослые СК находятся в нишах, которые защищают их «стволовую клеточность» [211].

Популяция СК характеризуется рядом ключевых характеристик: медленный/длительный временной цикл во время гомеостаза *in vitro*, слабо дифференцированные клетки, высокая способность к поддержанию стабильного генома во время репликации, сравнительно ограниченная пролиферативная активность, во время повреждений или помещения в культуру обладают способностью к увеличению большой эпителиальной клеточности за счет зрелых амплифицирующих клеток (ТАС) [61, 69].

Изучению роли лимба в патогенезе различных патологий роговицы посвящено множество работ.

I. Gipson считает, что отличительная черта лимбального окружения заключается в наличии системы кровоснабжения лимба [191]. Сосуды формируют палисады Фогта, состоящие из волнообразной сети, расположенной в зоне лимба. Палисады Фогта обеспечивают клетки зоны лимба большим количеством цитокинов и питательных веществ, являясь связующим звеном между сосудами и эпителием. Лимбальная базальная мембрана отличается от роговичной участками волнообразного переплетения со стромой, взаимосвязанными с примыкающими к базальной мембране фибриллами. Именно такое строение обеспечивает СК лимба своеобразной нишей, предохраняющей их от травм и изменений в микроокружении. Автор предполагает, что различный состав лимбальной и роговичной базальных мембран играет решающую роль в развитии популяции эпителиальных клеток в этих зонах. Для ЛСК характерна миграция от периферии к центру роговицы [45, 155].

К настоящему времени для выделения первичной культуры ЛСК и культивирования существуют два способа:

- ферментативная обработка лимбального биоптата;
- метод экспланта (миграционный).

В первом варианте биоптат из лимбальной зоны подвергают ферментативной обработке для отделения клеток от внеклеточного матрикса с последующим высевом в культуральные флаконы (на поверхность амниотической мембраны, мягкой контактной линзы или другой подходящий субстрат) с питательной средой и ростовыми факторами, культивируют в условиях *in vitro*. Во втором варианте биоптат разрезают на мелкие части и без ферментативной обработки помещают на культуральный пластик. По необходимости пластик может быть обработан адгезивными белками внеклеточного матрикса для ориентированной адгезии и распластывания клеток. В процессе культивирования могут присутствовать или отсутствовать субстраты для культивирования, сыворотка, факторы роста и т.д.

Доказано, что клетки лимбальной зоны являются прогениторными (клетки-предшественники) для роговицы [120].

Регуляция пролиферации и дифференцировки ЛСК является результатом сложного молекулярного взаимодействия с окружающими клетками/нишами, растворимыми факторами роста и компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ) [178].

В свете разработки новых способов восстановления глазной поверхности у пациентов с ЛН основной проблемой биологии СК роговицы остается способ идентифицировать СК *in vitro* и *in situ*. До недавнего времени идентификация ЛСК в основном основывалась на общих свойствах СК, например: отсутствие дифференцировки, длительное сохранение метки, направленная способность к пролиферации, о чем свидетельствует клоногенный анализ.

В последние годы был предложен ряд молекулярных маркеров для компартмента ЛСК, однако их роль в отличие от ЛСК их раннего потомства все еще обсуждается. Данные исследований позволяют предположить, что для идентификации базальных эпителиальных клеток лимба роговицы человека необходима комбинация маркеров, ассоциированных с дифференцировкой (например, C3/12, cx43) и предполагаемых маркеров, ассоциированных с СК (например, ABCG2, K19, vimentin, α 9), которая может обеспечить

подходящую характеристику [133]. Одним из основных маркеров в идентификации является р63-транскрипционный фактор. Экспрессия р63 наблюдается в ядрах ЛСК, но может присутствовать и в базальных клетках эпителия центральной роговицы. Показано, что альфа изоформа р63 ($\Delta Np63$) специфична для ЛСК. Предложено для идентификации еще один маркер—ABCG2—АТФ связывающий транспортер. Предполагается, что ABCG2 является универсальным маркером для поддержания прогениторного потенциала СК, где определяется его роль в транспорте регуляторных молекул, необходимых для дифференцировки, пролиферации и апоптоза. Локализация определяется в цитоплазме клеток и на мембране ЛСК. Показано, что экспрессия ABCG2 в ЛСК *in vitro* обладает клоногенной активностью и может рассматриваться как признак стволовости [141].

Таким образом, специализированная микросреда или ниша, которая регулирует поддержание, самообновление, активацию и пролиферацию СК с помощью внешних сигналов является одним из ключевых условий функционирования СК. Идентификация специальных параметров ниши может не только помочь понять регуляцию ЛСК, но и улучшить избирательное обогащение и экспансию *in vitro* для реконструкции роговицы глаза человека [171].

1.3. Микроокружение и факторы, определяющие длительность существования лимбальных клеток

На примерах уже изученных клеточных систем, соответствующих определению ниш, прослеживаются принципы структурной и функциональной организации. Для них характерно хорошее снабжение нервными окончаниями и кровеносными сосудами, обеспечивающими физическую защиту СК. Клетки, образующие нишу, создающие микроокружение для СК, в свою очередь могут содержать стволовые, за счёт которых и поддерживается микроокружение.

В состав ниши СК можно включить окружающие клетки, внеклеточный матрикс (ВКМ), который на границе эпителиальных и мезенхимальных тканей представлен базальными мембранами, и «молекулярную среду», в которой находятся СК.

ВКМ выступает как сложно организованная трёхмерная структура, несущая большую информацию, и представляет не только субстрат для прикрепления клеток, но и принимает участие в формировании генетической информации. Взаимодействие с ВКМ регулирует пролиферацию, дифференциацию СК, экспрессию генов. Многие регуляторные молекулы находятся в матриксе в связанном виде. Факторы роста обладают способностью взаимодействовать с клеточными рецепторами.

Эпителиальные клетки имеют большой набор рецепторов, обеспечивающих прикрепление к базальным мембранам [126]. Интегрин $\alpha 2 \beta 1$ используется для связывания с коллагеном IV типа [119]. Обеспечивая адгезию клеток к базальной мембране, интегрины передают сигналы, с помощью каскада-митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), тем самым обеспечивая жизнеспособность СК. Благодаря такой согласованности фокальных контактов происходит взаимодействие факторов роста и интегринов в процессе образования специальных сигналов от растворимых митогенов и сигналов. Формируются таковые в результате контакта с ВКМ и при трансляции механических напряжений в плазматической мембране [115]. Интегрины совместно с факторами роста обеспечивают жизнеспособность клеток. Происходит это за счёт усиления экспрессии проапоптических генов [151] и подавления экспрессии проапоптических [173].

В нормальных условиях общая численность клеток в ткани определяется балансом процессов их роста и гибели. Дифференцировка постмитотических клеток роговического эпителия связана с апоптозом или запрограммированной гибелью клеток [165]. Как известно, апоптоз возникает в результате истощения так называемых факторов выживания, представляющих собой совокупность воздействия на клетку определенных гормонов, факторов роста, ВКМ и сигналов

микроокружения. Вследствие тесной связи с ЛСК имеют постоянный доступ к факторам выживания, что невозможно для центральных клеток роговицы. Подлежащие стромальные клетки также модулируют функции ЛСК путем выделения клеточных факторов выживания. Установлено, что фибробласты лимба человека выделяют антиапоптотические факторы, что совсем несвойственно роговичным клеткам [223]. S.Tseng и соавт. [66] при культивировании лимбальных фибробластов обнаружили неизвестный ранее белок, препятствующий апоптозу и обеспечивающий тем самым клеточное выживание, который по активности превышал все известные эпителиальные митогены или их комбинации. Полученные данные свидетельствуют, что антиапоптотические факторы определяют длительность существования ЛСК, а их уменьшение способствует дифференцировке СК в ТА-клетки. Последние представляют собой более дифференцированное потомство СК, обладающее меньшим пролиферативным потенциалом и лишенное способности контролировать процессы возмещения и замещения утраченных клеток в процессах гомеостаза и тканевой регенерации.

Цитокины играют ключевую роль в поддержании ЛСК. Известно множество комплексных ауто- и паракринных взаимодействий между эпителиальными клетками и фибробластами роговицы и лимба. В глазу цитокины вырабатываются клетками стромы роговицы и эпителия, эпителиальными клетками хрусталика, клетками пигментного эпителия, цилиарного тела и клетками Мюллера.

Все цитокины полифункциональны, но их условно делят на несколько групп: интерлейкины, факторы роста некроза опухоли, интерфероны. Учитывают их биологический эффект. Действие цитокинов осуществляется по каскадному принципу – усиливается секреция одного из медиаторов, приводящая к стимуляции или подавлению продукции другого. Но при этом биологически важные эффекты, такие как противовоспалительные и провоспалительные, ангиогенные и другие, могут меняться. Определение цитокинов проводят с помощью проточной цитофлюориметрии,

иммуногистохимии *in situ*, иммуноферментного анализа (ИФА), вестерн-блоттинга, методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Установление качественной и количественной местной продукции цитокинов помогает исследовать их роль в развитии местного воспаления оболочек глаза.

D. Li и S. Tseng [205] выявили 3 определяющих типа цитокинов. Цитокины I типа выделяются роговичными эпителиальными клетками. К ним относятся: трансформирующий фактор роста α (TGF α), интерлейкин 1β (IL- 1β) и фактор роста тромбоцитов (PDGF). Цитокины II типа: инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), трансформирующие факторы роста $\beta 1$ и $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$) и фактор роста фибробластов (FGF). Они влияют на активность эпителиальных клеток и фибробластов. Цитокины III типа – фактор роста кератиноцитов (KGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF) – вырабатываются фибробластами и стимулируют пролиферацию и миграцию роговичного эпителия [220]. При травме или других стрессовых ситуациях эпителиальные клетки выделяют IL- 1β , стимулирующий секрецию цитокинов II типа, включая KGF. KGF, в свою очередь, активирует процесс деления ЛСК. Фактор роста гепатоцитов, выделяемый фибробластами стромы роговицы, стимулирует затем миграцию новых эпителиальных клеток для замещения потерянных при травме.

В норме цитокины не секретируются в низких концентрациях, но при развитии воспаления, иммунного ответа или патологии, их продукция существенно усиливается. Главными клетками – продуцентами являются фибробласты, эндотелиальные клетки (активированные стромальные клетки), моноциты, лимфоциты, в основном клетки cd4. В глазу такими клетками-продуцентами являются кератиноциты, клетки слезной жидкости, пигментного эпителия сетчатки, радужки, цилиарного тела, эпителия хрусталика, сосудистого эндотелия.

Межклеточные контакты играют значимую роль в процессе развития, поддержания тканевого гомеостаза и морфогенеза [197]. В формировании межклеточных контактов и морфогенетических процессов ведущую роль играют

кадгерины. Значимость межклеточных контактов хорошо видна на примере эндотелия. Одиночные клетки эндотелия, культивируемые в суспензии, погибают даже в присутствии фактора роста FGF-2 и VEGF. Если же формируются сфероиды, то происходит поляризация поверхности и клетки приобретают такой фенотип, при котором они сохраняют жизнеспособность и в отсутствии факторов роста. Кадгерины обеспечивают конфигурацию клеток в трёхмерных тканевых структурах в онтогенезе [102]. Экспериментально доказано, что экспрессия кадгеринов оказывает влияние на сортировку и распластывание клеток и формирование трёхмерных структур в системе *in vitro* [90]. Экспрессия кадгеринов может быть одним из возможных маркеров СК лимба, составляющих около 10% от всей популяции. Тогда как транзиторные клетки центральной части роговицы на кадгерин вообще не окрашиваются [106]. N-кадгерин участвует в адгезии СК к клеткам ниши, в частности меланоцитам и транзиторным клеткам роговицы. Приведённые данные показывают, что взаимодействие с базальной мембраной и соседними клетками является важным фактором микроокружения СК, определяющим поддержание жизнеспособности, миграцию и пролиферацию СК.

Контакт с базальной мембраной и межклеточные взаимодействия направлены на поддержание жизнеспособности СК благодаря инициации различных сигнальных путей. Более того, синтезируемые в нише различные факторы роста также поддерживают жизнеспособность СК. Адгезия СК к базальной мембране является главным фактором для поддержания жизнеспособности. Рецепторы СК напрямую взаимодействуют с ВКМ, и потеря контакта с базальной мембраной вызывает аноикс (особый вид апоптоза) СК [199]. Гибель клеток в результате потери контакта с базальной мембраной – активный процесс, вовлекающий несколько сигнальных систем. Однако в некоторых случаях СК могут покидать нишу и возвращаться обратно без потери жизнеспособности. СК оказываются защищенными от апоптоза, приобретая миграционный фенотип. Это фактор имеет большое значение во время регенерации, когда многие СК мигрируют в новые ниши.

Учитывая то, что в нише создаются оптимальные условия для поддержания жизнеспособности, есть два нюанса, когда апоптоз происходит в СК. Апоптоз, связанный с регулированием числа СК, о чем свидетельствует эволюционно стабильное большое количество сигнальных путей, обеспечивающих наступление апоптоза. В ряде случаев апоптоз может вызываться недостатком трофических факторов или необратимым повреждением молекул ДНК [95]. Накопление эндогенных повреждений ДНК, таких как двунитевые разрывы, вызванные реактивными формами кислорода, приводит к старению и гибели СК [74, 139]. Апоптоз пораженных СК может служить механизмом защиты генетической информации в организме.

Большие технические трудности и сложная сеть сигнальных путей не позволяют достаточно изучить их роль в регуляции СК и их ниш. Нарушение регуляции СК в нише часто служит причиной неопластического роста и образует сложную сеть [217].

Длительное поддержание СК в организме обеспечивается межклеточными и внутриклеточными сигналами. Клетки ниши объединяют сигналы, поступающие от внешней среды и от организма, исходя из этого, происходит контроль поведения СК. Для поддержания жизнеспособности СК необходима экспрессия некоторых генов, а также способность клеток ниши продуцировать факторы роста. Внешние и внутренние генетически детерминированные факторы контролируют размер ниши [71]. Если в нише имеется недостаток СК, то преобладают симметрические деления, которые увеличивают численность СК. Ниша способна контролировать дифференциацию клеток.

Асимметричное деление клеток широко распространено у организмов, находящихся на самых разных уровнях организации. При асимметричном делении СК только одна из двух дочерних клеток остается в нише и сохраняет свойства стволовой. Другая клетка переходит в транзитный компартмент, дифференцируется и выполняет специализированные функции. Темп пролиферации и число СК в нише может выполнять разные функции, связанные с самоподдержанием СК.

Для асимметрического деления клетки необходим ряд согласованных действий. В процессе адгезии к базальной мембране устанавливается поляризация СК. Это происходит вследствие неравномерного распределения некоторых детерминант в кортексе и цитоплазме. Далее, вдоль оси поляризации должно расположиться митотическое веретено. Образовавшие дочерние клетки должны содержать разные детерменты, от которых зависит их дальнейшее предназначение.

При особых условиях СК могут покидать и вновь возвращаться в свои ниши. Эта способность называется хоминг (от англ. Home – направляться домой), что является одним из главных критериев СК. Процесс, обратный хомингу, называется мобилизация и зависит от многих внешних воздействий. Эти два процесса возможны вследствие того, что в течение определенного времени СК сохраняют жизнеспособность вне ниши, а последние могут оставаться незанятыми [158]. Хоминг – хорошо координированный многоступенчатый процесс, в котором участвуют сигналы, посылаемые нишей, интегринами СК и другими факторами [192]. Этот процесс обеспечивает миграцию СК в новые ниши также и в процессе онтогенеза. Для того, чтобы прогениторы приобрели способность к хомингу и стали функционирующими СК, необходим их контакт с клетками стромы [206]. Это значит, что хоминг проявляется по мере возникновения взрослых СК. Не все СК в равной степени хорошо находят свои ниши из-за различной экспрессии рецепторов хоминга.

С возрастом организма свойства ниши могут меняться. Поэтому при клеточной терапии регенеративный потенциал СК у пожилых пациентов может зависеть не только от стимулирующего эффекта СК, но и от негативного влияния старых тканей на трансплантированные клетки. Как правило, СК имеют возможность дифференцироваться в нескольких направлениях в зависимости от микроокружения. Согласно новым данным, при изменении компонентов ниши (микроокружения) может измениться и направление дифференциации СК. Это может означать, что СК непрерывно взаимодействует с нишей для поддержания своего статуса. Репрограммирование СК может происходить в процессе

развития, когда СК перемещаются в новые ниши. Но репрограммирование может происходить и в экспериментальных условиях.

Клетки центральной части роговицы, которые можно считать транзиторными, хорошо отличаются от клеток лимба, в котором сосредоточены СК [89]. В базальных клетках роговицы экспрессируется кератин СК3, тогда как в лимбе этот кератин не экспрессируется. Espana et al. [196], изучая влияние микроокружения (стромы) лимба на поведение клеток центральной роговицы в процессе культивирования, показали, что клетки роговицы приобретали свойства СК, в частности в них не синтезировался кератин СК3.

Таким образом, ниша оказывает регулирующее влияние на жизненный цикл ЛСК, постоянно контролирует обновление клеток эпителия роговицы в норме и при её заболеваниях.

1.4. Современные методы применения лимбальных стволовых клеток при лечении дефектов роговицы различной этиологии

Тяжелые ожоги и травматические повреждения неизменно сопровождаются грубыми повреждениями покровного эпителия и приводят к деформации, рубцеванию, формированию помутнения роговицы [9, 47]. Лечение такого ряда заболеваний возможно при усовершенствовании комплекса лечебно-реконструктивных мероприятий, который включает 2 вида реконструктивных операций:

- хирургические операции, ориентированные на замещении камбиальных клеток;
- хирургические операции, формирующие условия для полноценного замещения собственных клеток.

В настоящее время трансплантология занимает лидирующую тенденцию в офтальмохирургии. Введение стволовых фетальных клеток (ФК) основано на способности клеток замещать утраченные структуры в организме больного.

Происходит стимуляция и регенерация, а также синтезируются биологические активные вещества [18, 39]. В офтальмологии появились сведения о применении ФК заднего эпителия роговицы человека для лечения различных патологий органа зрения, а именно, при лечении хронической буллезной кератопатии [37]. При данной процедуре осуществляют имплантацию субконъюнктивально клеточной суспензии культивированных *in vitro* ФК заднего эпителия роговицы человека. В результате уменьшается степень отека роговицы, восстанавливается её прозрачность, купируется роговичный синдром.

Для создания оптимальных условий, обеспечивающих реконструкцию эпителиального слоя поверхности роговицы, применяют разнообразные материалы и тканевые компоненты; биологического [4, 16, 24, 32, 58, 68, 212] и неорганического происхождения [50, 62, 154]. В данный момент используются разнообразные хирургические способы лечения патологии эпителиального слоя роговицы и слизистой оболочки глаза [6, 28, 53]. Применяемые методы замещения дефектов слизистой ротовой полости, пищевода, перемещения конъюнктивы приводят к длительному заживлению, развитию атипичной для этого участка слизистой, прорастанию вновь образованных сосудов. Недостаточно эффективный результат проведенных хирургических манипуляций, повторные рецидивы заболеваний позволяют считать регенерацию патологического участка поверхности глазного яблока в послеоперационный период неполноценной.

Для восстановления утраченных региональных СК выполняется алло– или аутооттрансплантация здоровых участков лимбальной ткани. Однако во избежание возникновения тканевой несовместимости и иммунного ответа, возникает необходимость применения иммуносупрессивных препаратов [3, 22, 34, 112, 124].

Трансплантация ЛСК роговицы при хирургических операциях восстанавливает дефицит СК по периферии роговицы, так как стволовые клетки пациента не способны восстановиться после повреждения. Непрерывно незаживающие дефекты эпителия роговицы могут быть вызваны тяжёлыми

химическими ожогами и выраженной непереносимостью контактных линз, что впоследствии приводит к неспособности СК эпителия роговицы к регенерации.

Трудноизлечимые постоянно незаживающие эпителиальные дефекты роговицы предрасположены инфицированию, что в результате может привести к рубцеванию и/или перфорации. СК эпителия роговицы находятся в основании эпителия на лимбе (месте соединения конъюнктивы с роговицей). Так как роговичный трансплантат применяется только для центральной области роговицы, лечение плохо заживающих дефектов эпителия требует трансплантации ЛСК роговицы. Такие клеток роговицы могут быть трансплантированы из здорового глаза пациента или трупного донорского глаза.

Поврежденные СК эпителия роговицы пациента удаляют, частично иссекая эпителий и поверхностную строму лимба. В подготовленное место помещают лимбальный донорский трансплантат. Донорские лимбальные клетки образуют новые, последние заживляют эпителиальные дефекты, покрывая роговицу.

К настоящему моменту имеется некоторый опыт применения в клинике культивированных СК. Впервые Tsai R. et coll. (2000) применили новый метод лечения в 6 случаях для пациентов с односторонним частичным или тотальным СЛКН. Для последующего культивирования на криоконсервированной интактной АМ был взят при биопсии из контралатерального глаза аутобиоптат. Наблюдая за пациентами в течение 15 месяцев, был получен успешный результат - увеличение зрения в 83% случаев в реэпителизации без васкуляризации в 100%.

Немного позже Koizumi N. et al. (2001) для достижения эпителизации применили новый способ у 2 пациентов с острым синдромом Стивенса-Джонсона. Для этого на поверхности АМ, лишенной своего эпителия, культивировали аллогенную донорскую роговицу с добавлением 3Т3-фибробластов. Область дефекта поверхности роговицы была покрыта полученным клеточным слоем. В результате достигнутая эпителизация стабильно сохранялась в течение последующих 6 месяцев. В дальнейшем этот же метод авторы применили при лечении пациентов с тотальной ЛН. Период наблюдения составлял 1 год. Только у 3 пациентов из 13 пациентов не возник

рецидив

первичной

патологии.

Schwab I.R et al. (2002) применяли для лечения культивированные ауто- и аллогенные лимбальные клетки эпителия роговицы, выращенные в культуре, содержащей 3T3 фибробласты. Затем переносили на АМ, лишенную эпителия. Эпителизация присутствовала у 60% пациентов с аллогенным материалом. Shimazaki J. et al. (2002) сообщили о проведенных трансплантациях культивированных эпителиальных клеток лимба, полученных от близких родственников. В половине случаев была достигнута эпителизация роговицы, у 30% пациентов был отмечен ороговевающий эпителий, у 1 пациента результат не был достигнут. У этих авторов получены успешные результаты пересадки культивированных клеток и трансплантации АМ.

После проведенной благополучной трансплантации культивированных лимбальных клеток на интактной АМ (без добавления фибробластов) Grueterich M. et al. (2003) были сделаны иммуногистологические исследования. В результатах показано, что трансплантированная АМ интегрируется в структуру роговицы и эпителиальные клетки имеют фенотип лимбальных эпителиальных клеток, не экспрессирующие конексин Сх43 и кератин К3. Это свидетельствует о свойствах лимбальных клеток, которые недолгое время сохраняют их в несвойственной им среде - в центральной части роговицы. В течение 2 лет роговица оставалась прозрачной, гладкой, аваскулярной, что свидетельствует о поддержании лимбальных эпителиальных клеток своей популяции на поверхности роговицы.

Для лечения пациентов при тотальной ЛН Nakamura T. et al. (2004) применили культивированные эпителиальные клетки аутослизистой ротовой полости на АМ. В последствие отмечали уменьшение степени выраженности рубцовых изменений конъюнктивы, уменьшение количества новообразованных сосудов на поверхности роговицы, а также улучшение остроты зрения.

Таким образом, к настоящему времени для лечения дефектов роговицы различной этиологии предложено множество модификаций тканевых трансплантаций. Однако ввиду недостатка донорского материала многие

исследователи ведут разработки новых способов лечения, связанных с культивированием ЛСК на различных субстратах. Такая методика обеспечивает взятие минимального объёма материала без нанесения повреждений зоне лимба. Культивирование ЛСК и КПЭ роговицы на поверхности АМ рассматривается в качестве альтернативы эпителия роговицы глаза человека.

1.5. Анатомо-функциональные особенности биологических субстратов для применения лимбальных стволовых клеток

С целью герметизации и восстановления дефектов роговицы широко распространено в офтальмологической практике применение синтетических и биологических материалов: альбуминовой пленки, аллопланта, роговицы, склеры, конъюнктивы, амниона, твердой мозговой оболочки, биологического клея, фибрина, коллагена, контактных линз, поликапролактона [27, 46, 144].

Однако при продолжительном влиянии повреждающего фактора повреждения роговицы, известные способы трансплантации роговицы имеют непродолжительный эффект, в последствии не могут предотвратить развитие рецидивов.

Учитывая многочисленные данные об успешном применении трансплантации культивированных ЛСК *in vitro* изучается возможность использования носителя для культивирования клеток с последующей трансплантацией. Для поиска необходимого субстрата выдвигают ряд необходимых качеств, такие как: прозрачность и прочность, биосовместимость и нетоксичность, отсутствие передачи гемотрансмиссивных заболеваний, при исследованиях *in vitro* и *in vivo* поверхность субстрата для культивирования ЛСК должна обладать адгезией, не менять своих свойств при сжатии и иметь низкую себестоимость.

По данным исследователей наиболее перспективными, с точки зрения клеточной терапии, рассматриваются следующие варианты [104]:

фибрин, коллаген, гидрогелевые мягкие контактные линзы, фиброин шёлка, спидроин, хитозан, кератин, поли-(ε- капролактон), полиметакрилат, полиэтиленгликоль.

Фибрин

Фибрин – высокомолекулярный белок, образующийся из фибриногена путем присоединения тромбина. Получены клинические результаты по применению фибрина как подложки для культивирования ЛСК. В ретроспективном анализе Feng Y. Et al. показано, что успех трансплантации ЛСК у 78% пациентов был связан с экспрессией p63 образующим голоклон в культуре СК, т.е. в культуре, содержащей более 3% окрашенных клеток. В культуре, где содержание окрашенных p63 составляло менее 3 % от общего числа клеток, успех трансплантации составил 11% пациентов. Однако недостаток субстрата состоит в передаче трансмиссивных заболеваний.

Имеются данные о применении прозрачного фибринового геля для эпителиальных клеток. Метод заключается в получении буккального эпителия методом экспланта с положительным окрашиванием на p63 [184]. Полученный многослойный эпителий на поверхности фибринового геля аналогичен характеристикам роговицы человека, обладает прочностью и прозрачностью. Данный вариант коммерчески доступен.

Коллаген

Впервые в 1985г. Geggel H. C и соавт. применил коллагеновый гель (Vitrogen), полученный из кожи быка. По результатам эксперимента показано, что эпителиальные клетки на 13 день легко адгезировались на поверхности коллагенового геля и формировали 3-5 слойный эпителиальный пласт. Считалось, что данный субстрат отвечает требованиям: коллаген легко доступен и прозрачен, аналогичен природному [153]. Но из-за большого содержания воды коллаген обладает низкой механической устойчивостью, существует риск иммунного ответа и затраты на его производство высокие.

Для соответствия требованиям производственной практики и производства терапевтических клеточных препаратов в 2012 г. Hannah J.

усовершенствовал методику и применил сжатие коллагена типа I. Проведённый анализ сохранившихся клеток и жизнеспособных показал, что при сжатии способность субстрата влиять на культивированные эпителиальные клетки не менялась [122].

Гидрогелевые мягкие контактные линзы

Исследователями Core A. и Horwitz V. изучена возможность использовать силикон-гидрогелевые мягкие контактные линзы как подложку для культивирования ЛСК при дефектах роговицы, осложненных ЛН. Эпителиальные клетки культивировались на обработанной 3Т3 фидерном слое с адгезией и пролиферацией, в процессе сохранялся фенотип СК [114].

Известен способ культивированных клеток в составе коллагенового геля на внутренней поверхности мягкой контактной линзы [40]. Для этого учитываются не только особенности репаративных и обменных процессов роговицы, её строения, а также особенности глазного яблока, но и свойства самой линзы. Для достижения терапевтического эффекта предварительно проводили некрэктомию поврежденной роговицы, формируя глубокое ложе для трансплантата. Данная процедура требует определенных хирургических навыков. Фиксацию трансплантата обеспечивали линзами большого размера, затем осуществляли некровавую блефарорафию, тем самым предотвращая трансплантат от рефлекторного повреждения век.

Таким образом, весь процесс представляется достаточно трудоемким, а эффективность его зависит от совокупности соблюдения всех упомянутых условий. При этом, по мнению авторов, происходит регенерация собственного эпителия за счёт биологических веществ, выделяемых клетками, т.е. за счёт миграции.

Фиброин шёлка

В регенеративной медицине нашли широкое применение изделия из фиброина шёлка. Из данного материала возможно восстановить костную и хрящевую ткань, сухожилия, печень, трахею, зубы, изготовить искусственные сосуды. Изделия из фиброина шёлка обладают высокой механической

прочностью, эластичностью и доступностью. Полимеры обладают способностью к биоразложению, а также возможностью приготовления композитных материалов [224]. По мнению авторов, фиброин шёлка – Тутовый шелкопряд (*Bombyx mori*) – это природный полимер, амфифильный белок с небольшим отклонением в сторону гидрофобности, нерастворим в воде, что способствует снижению адгезивности и увеличению пролиферации клеток [35]. Поэтому, для улучшения адгезивных свойств матрикса при культивировании фибробластов были внесены добавки. Изучено влияние добавок на адгезию и пролиферацию в процессе культивирования культуры фибробластов.

Проведено исследование на биосовместимость фибриновых плёнок путем трансплантации в строуму роговицы [85]. Субстрат обладал биосовместимостью, не вызывал воспалительной реакции, однако имел высокую себестоимость.

Спидроин

Spider (*Nephilia clavipes*) – каркасная нить из паутины, в отличие от *Bombyx mori*, это натуральное волокно, обработанное раствором спидроина. Не вызывает иммунного ответа и является потенциальным материалом для использования в создании биоинженерной конструкции [216].

Проведены исследования по использованию метода 3D-конструкции искусственной роговицы на основе спидроина и культивированных сфероидов, полученных из ЛСК [34].

Хитозан

Хитозан – представляет собой аморфно-кристаллический полимер, выделенный из панцирей ракообразных. Для медицины представляет особый интерес. В исследованиях рассматривается применение хитозана для усиления регенерации при повреждениях. Для создания биodeградируемых плёнок учитывают биосовместимость и низкую токсичность хитозана [26]. Но в соединениях плёнки обладают жёсткостью, поэтому для создания более эластичного каркаса добавляют желатин. Тем самым сохраняются механические свойства. Получена оценка полусинтетических полимеров на основе хитозана и желатина в качестве потенциального субстрата для трансплантации

культивированных ЛСК в соотношении 20:80. Ни один из полимеров не был токсичен, наблюдалась высокая пролиферация в питательной среде с отсутствием продуктов животного происхождения [92].

Кератин

Кератин – фибриллярный белок, обладает особой механической прочностью. Из кератинов состоят эпидермис кожи, волосы, ногти, перья и др. В регенерации роговицы кератин рассматривают как подложку для культивирования ЛСК. Проведено исследование *in vitro* с целью оценить параметры культивирования ЛСК на поверхности кератиновых плёнок, полученных из человеческого волоса в сравнении с АМ и полистиролом. В течение 14 дней наблюдали адгезию, миграцию и пролиферацию на кератиновых плёнках. Гистология показала, что многослойный эпителиальный пласт сходен с нормальным эпителием роговицы [103].

Поли-(epsilon- капролактон)

Поли-(epsilon- капролактон) – широко распространён в регенеративной медицине для восстановления кожи и костей, субстраты, полученные из волокон поликапролактона, обладают прочностью, прозрачностью и нетоксичны. Биосовместимость нановолокон исследовали путем культивирования ЛСК на поверхности матрикса [183]. Субстраты охарактеризовали по их морфологическим свойствам, способности увлажнения, механической прочности и оптическим свойствам с использованием сканирующей электронной микроскопии. По результатам гистологии ЛСК адгезивны к субстрату и сохраняют признак стволовости. Гидрофильность поверхности, достигнутая с помощью обработки плазмой, эффективно повышает прозрачность и способность биосовместимости матрикса.

Полиметакрилат, поли-этиленгликоль

В настоящее время ведутся исследования для разработки сложных, клинически значимых трёхмерных пористых матриксов с использованием композитной комбинации материалов. Различные факторы внеклеточной среды, контролирующие клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку,

учитываются для достижения поставленной цели и создания усиленной связи между биоматериалом и окружающей их биологической средой. Эффективность этой модификации материала на клеточную активность зависит как от дозы, так и от пространственно-временной зависимости [143].

Несмотря на успехи в разработке биомиметических каркасов из нановолокон для применения в тканевой инженерии, все еще остаются несколько нерешенных проблем: синтетические скаффолды снижают механическую устойчивость после культивирования СК; высокая стоимость производств; потеря эластичности; неполная миграция клеток с поверхности матрикса; риск трансмиссивных заболеваний.

Совокупность полученных результатов лабораторных, экспериментальных исследований обосновано доказывает, что культивированные *in vitro* на АМ стволовые эпителиальные клетки лимба роговицы и конъюнктивы обеспечивают рост и размножение СК. Огромная роль принадлежит АМ как уникальному субстрату. Это является основой в новом методе лечения патологии поверхности глаза, сопровождающей ЛН.

В последние 30 лет в качестве биопокрытия дефектов роговицы используют амниотическую оболочку. Состав АМ трёхслойный: амниотический эпителий, базальная мембрана и строма, состоящая из слоя фибробластов и спонгиозного слоя. Толщина колеблется от 0,02 мм до 0,5 мм. Внеплацентарная часть амниона покрыта кубическим или утолщенным эпителием, обладающим высокой метаболической активностью, а в плацентарной части представлен цилиндрическим эпителием. В цитоплазме содержится большое количество липидов (лецитин, фосфолипиды, кефалин и др.), протеинов, полисахаридов, мукополисахаридов, фосфорных соединений, а также значительный запас ферментов синтеза простагландинов (циклооксигеназы, простагландинсинтетазы, фосфолипазы). Важное значение в процессах регенерации поврежденной поверхности тканей играют факторы роста, содержащиеся в эпителиальных клетках. В базальной мембране, расположенной под амниотическим эпителием, представлена сеть ретикулярных волокон,

состоящая из значительного количества протеогликанов, которые, вероятно, выполняют барьерную функцию, участвуют в регуляции проницаемости АМ. Содержится значительное количество коллагена, гиалурона, бигликана и декорина, коллаген 1,3,4,5 и 7, ламинин и фибронектин.

К. Fukuda et al. (1999 г.) установили схожесть структуры ламинина 1,5, фибронектина и коллагена 7 типа в базальных мембранах конъюнктивы, роговицы и амниона. Это объясняет способность АМ к биоинтеграции в тканях глаза.

При проведении иммунологических анализов обнаружено, что АМ и хорион ведут себя неодинаково. Многочисленными исследованиями было подтверждено, что клетки эпителия амниона не имеют на своей поверхности HLA- A, B, C или DR-антигенов. Тем не менее, при радиологическом исследовании *in vitro* в среде культивированных амниотических клеток обнаружили, что небольшое количество данных веществ все же синтезируется.

Однако иммунологический ответ на трансплантат АМ не зарегистрирован: при исследовании на добровольцах не было выявлено ни одного случая клинического проявления острой реакции отторжения трансплантата. Также не выявлено ни одного случая продукции антител против HLA-антигенов. Напротив, хорион демонстрирует повышенную антигенную активность, что выражается в тяжелой иммунологической реакции.

Культивированные лимбальные клетки обладают пролиферативными характеристиками СК. Базальные эпителиальные клетки обладают продолжительным клеточным циклом и устойчивы к высоко ундулирующим эпителиальным соединениям. В базальных клетках лимба определяются высокие концентрации цитохром-оксидазы, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ азы. Имеются региональные различия в распределении и концентрации ретиноевой кислоты. За выполнение регуляторной функции отвечают концентрационные градиенты, а высокие уровни рецепторов эпителиального фактора роста могут поддерживать пролиферативный потенциал и ингибировать дифференцировку.

АМ обладает особенным тканевым составом [200] и функциями, которые способны усиливать адгезию, миграцию и пролиферацию ЛСК, а также предупреждать апоптоз эпителиальных клеток, подавлять развитие фиброза [118, 161, 174]. Особое внимание представляет наличие в клетках эпителия ламининов, которые играют решающее значение в обеспечении условий усиленной митотической активности СК и фиксации культивированных ЛСК на поверхности роговицы глаза человека.

Таким образом, для создания необходимых условий высокой пролиферативной активности ЛСК *in vitro*, необходимо следующее: потенциально обеспеченная высоким уровнем питательных веществ и цитокинов культура ЛСК; неповрежденная, прочная и эластичная амниотическая мембрана в качестве носителя культивированных клеток роговицы, чьи уникальные свойства моделируют образ своеобразной ниши для стволовых клеток роговицы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение и идентификация клеточных культур роговицы

Проведенные исследования отвечают принципам Хельсинкской декларации, принятой Генеральной ассамблеей 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.

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 патогенетического обоснования 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.

2.1.1. Выделение и культивирование лимбальных клеток и клеток плоского эпителия роговицы глаза человека

Метод культивирования является одним из традиционных и высокоинформативных способов изучения пролиферации, дифференцировки клеток и биологии тканей.

Анатомически лимб окружен сосудистой сетью (палисадами Фогта), обеспечивающими снабжение клеток этой зоны питательными веществами, регуляторными пептидами и представляет собой нишу для локально фиксированных лимфоцитов и регионарных стволовых/прогениторных клеток [67]. Недавно обнаруженные в лимбальной зоне СК, обладающие фенотипом, сходным с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга, благодаря своим паракринным свойствам и межклеточным взаимодействиям отвечают за процессы самоподдержания эпителиальных стволовых/прогениторных клеток и регенерации роговицы.

Для экспериментальных исследований были получены клеточные линии роговицы человека, полученные от пациента с диагнозом глаукома. Пациент не имел диабетического анамнеза (для исключения влияния метаболических аспектов), не принимал антибиотиков, глюкокортикостероидов 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 трансплантат со всей окружности лимба цельного энуклеированного глаза, при этом достигалась равномерная толщина трансплантата, 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 отсепарировали слой ткани на заданной глубине, придерживая лоскуты пинцетом, в результате получали лимбальные трансплантаты, представляющие собой полосу ткани шириной 2 мм и толщиной 0,5 мм по всей длине. Полученное корнеосклеральное кольцо помещали в стерильную чашку Петри $d=60$ мм (рисунок 2.1 А), 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 25см² обрабатывали коллагеном и фибронектином. На дно флакона наливали 8 -10 мл раствора. Через 20 минут инкубации при комнатной температуре раствор удаляли и осторожно промывали дважды питательной средой. Данную обработку проводили непосредственно перед внесением клеток. Корнеосклеральное кольцо измельчали до размера 2×2 мм и аккуратно помещали на дно культурального флакона (рисунок 2.1 Б), обработанного коллагеном или фибронектином. На 20 минут флакон помещали в термостат при $t=37^{\circ}\text{C}$ в перевернутом положении (рисунок 2.1 В).

Коллаген I типа был получен методом, предложенным S. Strom и соавт. [121] из сухожилий, связанных с позвонками хвоста крысы. Лимбальные трансплантаты, полученные от энуклеированного глаза, позволяют сохранить естественное микроокружение лимбальных эпителиальных прогениторных клеток. Дальнейшее культивирование осуществляли в питательной среде DMEM/F12 1:1 (Dulbecco Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 HAM, «Sigma», США), с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия), 5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферрина, 5 мкг/мл гидрокортизона, 5мкг/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 CO_2 инкубаторе при температуре 37°C , с 5%-ным содержанием CO_2 и 95% влажности. На протяжении этого периода наблюдали за сменой активности пролиферации клеток, их морфологии, отмечали временные интервалы изменений характеристик клеточных культур.



Рисунок 2.1. А - корнеосклеральное кольцо, Б - измельченные лимбальные лоскуты, В - культуральные флаконы 25cm^2 в термостате.

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

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

2.1.2. 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, α -SMA, CD 34, ALDH3A1, c-kit CD 117, EGFR, TGFb3, ABCDG 2, integrin β 1 (таблица 2.1).

Таблица 2.1 Антитела, использованные для иммуногистохимии

Антитела	Производитель, страна
p63 4A4 (pdm 136)	Diagnostic BioSystems, США
СК 19 (MAB 058-05)	Sigma, США
СК 3/12 (CBL-218)	Millipore, США
Pan-cytokeratin AE1/AE3 (IH CR 2025)	Sigma, США
Keratan sulfate (cornea, MAB 2020)	Millipore, США
ABCDG2 (AV-43649)	Sigma, США
EGFR (Mob 446)	Diagnostic BioSystems, США
TGFb3 (RP148-05)	Diagnostic BioSystems, США
Integrin β 1 (MAB 2513)	Millipore, США
c-kit CD 117 (A450229)	DAKO, США
Ki-67 MIB (IS62630)	DAKO, США
α -SMA	Sigma, США
CD 34	Sigma, США
ALDH3A1 (SC-137138)	Santa Cruz

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) соответственно запатентованной технологии [152].

При достижении монослоя ЛСК и КПЭ снимали ферментативным способом (при помощи раствора Трипсин/ Версен в соотношении 1:1 для получения клеточной суспензии). Приблизительно 1×10^6 клеток смешивали с 1,5 мл среды Игла («Биолот», Россия), помещали в конические полипропиленовые пробирки объёмом 15 мл («Cellstar tubes» 15 мл, Германия) и центрифугировали 1000 об/мин. в течение 5 минут. В осадок добавляли 400 мкл «Растворителя С» (изоосмотический раствор, необходимый для сохранения жизнеспособности клеток при окраске). Непосредственно перед окраской готовили 4×10^{-6} М раствор красителя, используя «Растворитель С». Быстро смешивали 1 мл клеточной суспензии и 1 мл красителя, аккуратно пипетируя. Быстрое и гомогенное перемешивание критично для равномерного мечения, так как окраска происходит сразу же после соединения с красителем. Периодически переворачивая пробирку, инкубировали добавлением 800 мкл ЭТС («Биолот», Россия). К полученной суспензии добавляли 800 мкл полной среды и центрифугировали клетки при 1000 об/мин. минимум 3 раза для отмывки от красителя.

Визуализация клеточных культур и гистологических препаратов с использованием методов микроскопии. Для оперативного получения качественной информации о состоянии культивируемых клеток в настоящее время используют специальные инвертированные микроскопы. Принцип инвертированности (перевернутости) заключается в том, что объект наблюдения освещается сверху, а наблюдение за живыми клетками в культуре, т.е. непосредственно во флаконах, где происходит процесс культивирования [20]. 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 ТК–С1300Е (Япония). Клеточные культуры микроскопировали при 40–, 100–, и 200–кратном увеличении.

Клетки ЛСК и КПЭ, окрашенные РКН26 и РКН76, визуализировали 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.

При визуализации клеточных линий ЛСК и КПЭ наблюдали клеточный рост со стороны обеих культур. При микроскопии ЛСК наблюдали максимальную способность к пролиферации: за 12 дней произошло увеличение от нескольких тысяч мелких округлых базальных лимбальных клеток до миллионов (рис.2.2 А, Б). Мигрировавшие клетки из экспланта хорошо распластывались и формировали пласт, имеющий вид ровного круга. Они представляли голоклон [180], в котором можно выделить плотно упакованные, компактизованные клетки, исходящие от экспланта и хорошо распластанные к периферии. После пассирования лимбальные клетки из округлых превращались в более удлиненные, формировали агрегаты. При этом между агрегатами возникали контакты, образованные длинными ламеллоподиями. Длинные отростки направлены в сторону движения колонны, а короткие – в противоположную. К 7–14 суткам культивирования достаточно крупные колонии, содержащие несколько тысяч клеток, начинали активно мигрировать (рисунок 2.3 А, Б). При появлении пролиферации осуществляли подсчет пролиферирующих клеток. Клетки подсчитывали в поле зрения микроскопа при 40– и 100–кратном увеличении. С целью определения митотического индекса клетки высевали на чашку Петри (35мм), на которой была нанесена сетка для подсчета (Costar–Corning, США).

Митотический индекс для каждой культуры рассчитывали в фазе логарифмического роста на 4 образцах, как количество митозов к общей клеточности культур (не меньше 1×10^6), умноженное на 1000 (в процентах).

$$\text{Митотический индекс (\%)} = \frac{п \text{ (количество митозов)}}{N \text{ (общая клеточность)}} \times 1000$$

Время цитогенерации проводили на 4 образцах через 24 часа после высевания клеток на чашки Петри, с временным интервалом в 12 часов в течение 3 суток. Тест на жизнеспособность проводили после ферментативного снятия клеток из культурального флакона.

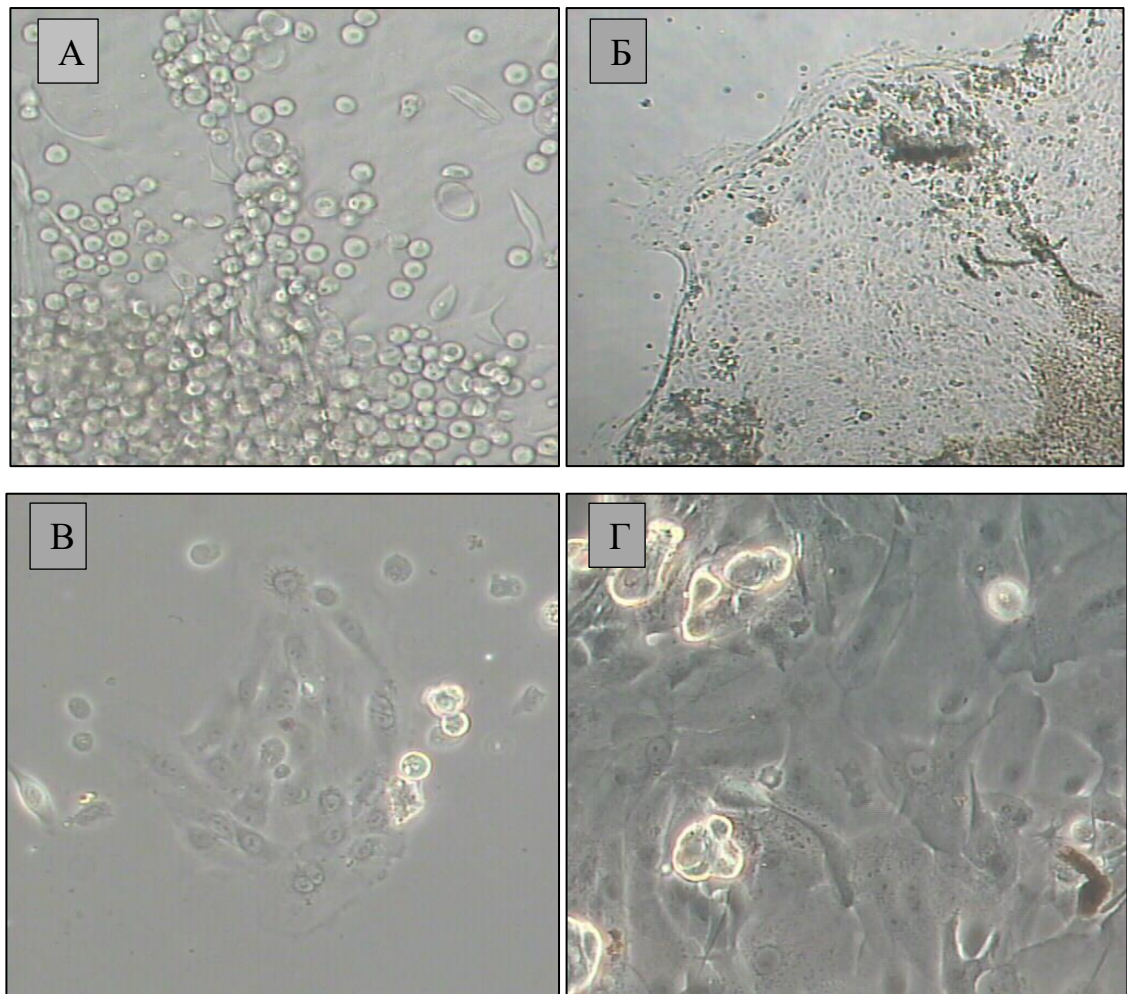


Рисунок 2.2. А - округлые базальные лимбальные клетки 4 сутки, фазово-контрастная микроскопия (ФКМ). Б - миграция клеток из эксплантата на 5-е сутки, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$. В - лимбальные клетки 1 пассажа. Г - лимбальные клетки 2 пассажа.

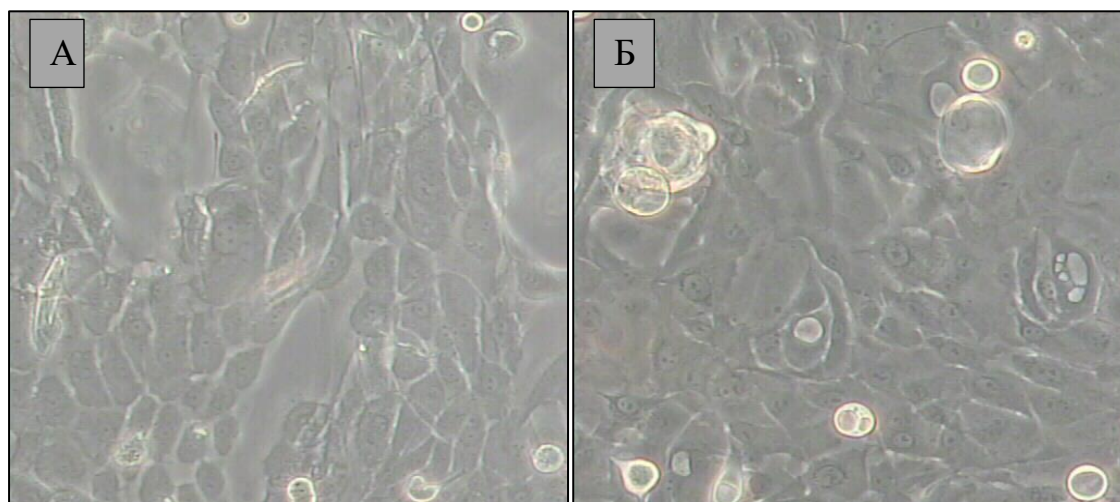


Рисунок 2.3. А - лимбальные клетки 3 пассажа. Б - лимбальные клетки 4 пассажа, ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 20$.

Клетки суспендировали в физиологическом растворе, помещали в полипропиленовую пробирку 2 мл («Cellstar tubes», Германия) для дальнейшей окраски, добавляли эквивалентный объём 4% раствора трипанового синего с 5 мин экспозицией. Проводили оценку жизнеспособности после ферментативной обработки, окраски и каждые 2 ч. в течение суток. В пяти квадратах камеры Горяева подсчитывали количество окрашенных (погибших) клеток, путем прямого микроскопического наблюдения. Процент жизнеспособности клеток в суспензии вычисляли по стандартной формуле:

$$\text{Жизнеспособность (\%)} = \frac{n \text{ (количество окрашенных клеток в 5 квадратах)}}{N \text{ (общая клеточность в 5 квадратах)}} \times 100$$

Получение гистологических препаратов. При пассировании клеточные культуры наносили на адгезивные предметные стекла Super Frost Plus («Menzel», Германия) и культивировали в течение нескольких дней, используя определённую клеточность. После достижения монослоя, стекла высушивали на воздухе и проводили регидратацию в солевом фосфатном буфере (PBS), высушивали, фиксировали, погружая в холодный ацетон -20°C на 2 минуты и

затем осуществляли иммуногистохимические (ИГХ) окрашивания на специфические маркеры: p63, цитокератин 19, цитокератин 3/12, кератан сульфат, виментин, α -SMA, CD 34, Ki 67.

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

2.1.3. Оценка функциональных свойств

Количественный МТТ–анализ пролиферативной активности клеточных культур. Для сравнения пролиферативной активности культур ЛСК и КПЭ проводили ММТ– анализ клеточной пролиферации (МТТ– Cell Proliferation Assay) [75] 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 (methylthiazoletetrazolium, 3– [4, 5– диметилтиазол–2–ил]–2, 5– дифенилтетразолия бромид) в нерастворимые в воде темно–синие кристаллы формазана.

Такое превращение возможно только в живых клетках в присутствии митохондриального фермента дегидрогеназы сукцината. Нерастворимый в воде формазан эллюируется из клеток с помощью органических растворителей (изопропанола или другого органического растворителя). Оптическая плотность эллюата измеряется спектрофотометрично ($\lambda=570\text{nm}$), определяя поглощение как функцию от концентрации превращенного красителя, количество которого прямопропорционально количеству метаболически активных клеток в культуре.

В эксперименте использовался краситель МТТ («Sigma», США), изопропанол («Merck», Германия). Культивирование клеточных линий ЛСК и КПЭ проводили в 24–луночных планшетах («Costar», Германия) в течение двух недель. В каждую лунку добавляли по 1 мл раствора МТТ в культуральной среде

DMEM в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали с клетками в течение двух часов в CO₂ инкубаторе и 95% влажности. Конвертированный таким образом краситель вымывали из клеток изопропанолом. 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.

Пролиферация культур ЛСК и КПЭ описывается дифференцированным уравнением баланса:

$$dx/dt = \gamma x - \sigma x = \varepsilon x \quad (2.1)$$

где dx/dt – скорость изменения числа клеток, γ – скорость митоза за единицу времени, σ – скорость клеточной гибели (апоптоз, гибель из-за трипсинизации и др.) за единицу времени, ε – относительная (удельная) скорость роста клеточности, x – число клеток в момент времени t .

ε также называют коэффициентом прироста, он характеризует внутреннюю способность живых организмов к увеличению численности при отсутствии лимитированных факторов, вычисляется экспериментально на базе неограниченного роста.

При достижении 100 % монослоя происходит контактное торможение, клетки перестают делиться. Модель составлена при условии постоянного пассирования клеточной культуры.

Модель Мальтуса получается путем интегрирования выражения (2.1)

$$x(t) = x_0 e^{\varepsilon t} \quad (2.2)$$

где x_0 – начальная клеточность

Клеточность двух разных клеточных линий в момент времени t зависит от x_0 и ε каждой линии. Модель не учитывает ограниченной способности клеток к делению, так называемый лимит Хейфлика (эмбриональные фибробласты человека в культуре делятся 50 ± 10 раз), который является лимитом и для мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [72, 89, 189]. Можно считать эту модель характерной и для ЛСК, так как голоклоны в культуре могут проходить до 100 генераций [14]. Таким образом, одна клетка в процессе митоза, в среднем, дает $2^{50} = 1.126 \times 10^{15}$ клеток.

Удельную скорость клеточности находили, используя в выражении (2.2) и получали уравнение (2.3) для x в момент времени t_1 и t_2 :

$$\varepsilon := \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{t_2 - t_1} \quad (2.3)$$

Изначальное количество клеток находили методом подбора, в наиболее полной ответственности теоретической кривой с практически полученными данными. Для культур ЛСК и КПЭ начальное число клеток x_0 , показывает количество клеток, которые делятся и теоретически должны находиться в культуре после выделения для воспроизведения практически полученной зависимости количества клеток от времени культивирования.

Время, в течение которого клетки сохраняют способность к пролиферации, вычислялось по формуле, полученной из закона Мальтуса (2.4):

$$t_{\max} := \frac{\ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right)}{\varepsilon} \quad (2.4)$$

Как отметил Stanescu с соавторами [194], моделирования клеточного роста во многих случаях – тяжелая задача из-за нехватки и разброса данных. Было предложено включать коэффициент внезапности в модель. Но в нашем случае

это не является необходимым условием, так как в ходе вычислений полученные значения удельной скорости роста и исходного количества клеток больше нуля.

В различных исследованиях оспариваются оптимальные условия культивирования ЛСК [187].

На общее количество ЛСК скорость пролиферации и морфологию клеточных культур может влиять концентрация сыворотки [125] и глюкозы [196] в культуральной среде, наличие глутамина и основного фактора роста фибробластов (bFGF), эпидермального фактора роста (EGF), аскорбиновой кислоты [116], инсулина, изопротеринола, гидрокортизона, трансферрина, плотность посева клеток, качество поверхности пластика, а также возраст донора и стадия заболевания [201].

2.2. Культивирование на поверхности амниотической мембраны

2.2.1. Методика создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека

Данные исследований анатомо-функциональных особенностей биологических субстратов и морфофункциональное состояние ЛСК и КПЭ позволили патогенетически обосновать методику создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека, который отвечал бы всем техническим требованиям. Проблема дефицита донорских роговиц и преобладающего количества пациентов, ожидающих очереди на кератопластику, на протяжении многих лет и возможности культивирования *in vitro*, позволяют посмотреть на эти проблемы с новой позиции.

Прототипом предложенного способа является способ получения трансплантата лимбальных клеток на амниотической оболочке, где используют замороженную амниотическую оболочку, лишенную клеточного состава, на которую размещают лимбальные стволовые клетки и культивируют в питательной среде в 6-ти луночных планшетах [12].

Недостатком этого способа является то, что клетки адгезируются на поверхности АМ, которая помещена в лунку гораздо больше своего размера и в процессе культивирования неплотно прилегает к дну планшета, из-за этого большее количество клеток прикрепляется к пластику, а не к поверхности субстрата. Это приводит к тому, что значительное количество клеток не прикрепляется к мембране и взаимосвязь с субстратом непрочна, что способствует длительному культивированию. Вероятно, что клетки прикрепляются к пластику значительно быстрее, чем к скользкой поверхности АМ, которая не зафиксирована в луночном плато. К тому же, неизвестно, культивирование на какой стороне АМ является наиболее благоприятным для создания межклеточных связей или связью с поверхностью носителя.

Задачей предложенного способа было получение биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека на стороне базальной мембраны и стромальной стороне АМ, которая способствовала бы сохранению максимально возможного количества клеток при послойном культивировании для их пролиферации и дифференцировки.

Для улучшения предыдущей технологии использовали усовершенствованную методику [42]. В 8-ми луночное плато (μ -Slide 8 well, IBIDI, GmbH), где каждая лунка $1\text{ см} \times 1\text{ см}$ и помещенная АМ плотно прилегала к пластику, совершали дозированное нанесение клеток до достижения необходимой клеточности. Поставленную задачу решали тем, что в способе получения биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека, который включает использование криозамороженной АМ, первичное выделение лимбальных клеток с зоны палисадов Фогта, содержащих в своем составе стволовые, первичное выделение КПЭ роговицы, осуществляли культивирование до необходимой клеточности следующим образом: АМ трижды промывали в растворе PBS («Sigma», США), аккуратно расправляли на стерильной фольге и разрезали на небольшие кусочки размером $1\text{ см} \times 1\text{ см}$ (рис.2.4 А, Б). В 8-ми луночные плато помещали по восемь образцов стромальной стороной вверх и восемь – базальной мембраной. Наносили на поверхности

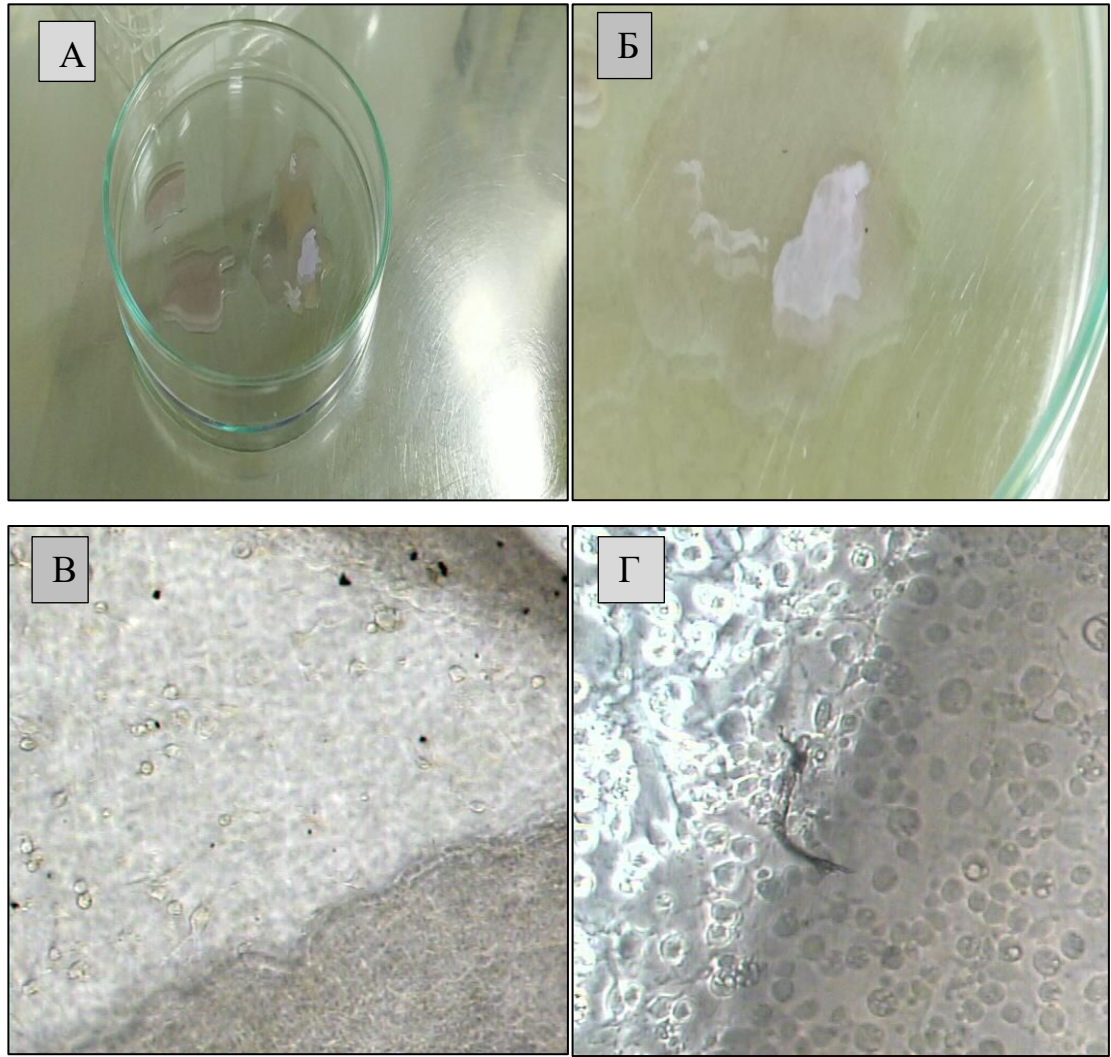
амниона по 10 тыс. ЛСК в 200 мкл питательной среды DMEM/F12 1:1 («Sigma», США), содержащей 10% ЭТС и ряд ростовых факторов. Смену сред проводили каждые 24 часа в течение 4 суток. Культивирование осуществляли в стандартных условиях в CO₂ инкубаторе с влажностью 95% при температуре 37C° (Гринь В.К. с соавт., 2011). На протяжении этого периода наблюдали за сменой активности пролиферации клеток, их морфологией (рис.2.4 В, Г). 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 биологического субстрата была выбрана сертифицированная криозамороженная АМ, протестированная на контаминацию к возбудителям инфекций, которая представляет собой биогенный стимулятор, обладающий прочностью и пластичностью.

Имеется множество противоречивых публикаций по поводу правильного расположения амниона на поверхности роговицы как биопокрытия. Оболочка может быть фиксирована к поверхности роговицы основной мембраной (базальной) эпителия, обращенной вверх и стромальной стороной, обращенной вниз к глазу (предпочтительная техника) или стромальной стороной амниона вверх.

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 мембраны гладкая, блестящая и не обладает адгезивными свойствами. Определенную трудность составляет дифференцировка сторон у АМ после криозамораживания. Стромальная сторона амниона утрачивает свою «липкость».

Для исследования были использованы активно пролиферирующие клеточные линии ЛСК и КПЭ роговицы человека, протестированные на контаминацию к возбудителям инфекций.



Рисинок 2.4. А, Б - размороженная АМ после криоконсервации в питательной среде. В - 1 сутки культивирования ЛСК на поверхности стромальной стороны АМ. ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$. Г- 4 сутки культивирования ЛСК на стромальной стороне. ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 10$.

В качестве контроля использовали небольшие лоскуты АМ, помещенные в 24-луночное плато с питательной средой без добавления клеток, 8 образцов помещали стромальной стороной верх и 8-базальной.

Клинический интерес к СК резко возрос в последние два десятилетия, однако возникает необходимость в стандартизации отдельных образцов, полученных в различных лабораториях. Методы выделения, экспансия клеток, как правило, отличаются, что безусловно влияет на свойства и состав клеток.

Количество тканей, из которых, на данный момент, показано успешное выделение МСК, растёт с каждым годом.

В настоящее время известны методы получения МСК из костного мозга, кожи, синовиальной оболочки и жидкости, жировой ткани, различных фетальных тканей человека. В данной главе описано возможность выделить ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека, определить принадлежность клеток лимба к СК, оценить тенденции поведения клеток в монослойной культуре и в многослойном культивировании на поверхности АМ.

2.2.2. Идентификация биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека

Получение гистологических препаратов. Для изучения процессов, происходящих на поверхности субстрата и между монослоями культивированных клеток, после завершения культивирования часть образцов помещали в нейтральный забуференный 10 % раствор формалина (рН 7,4) и фиксировали в течение 24 часов. После дегидратации кусочки заливали в парафин по стандартной методике. На ротационном микротоме Shandon Finesse 325 (Thermo Scientific, США) изготавливали серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Затем удаляли парафин из срезов в толуоле, проводили по спиртам нисходящей концентрации и доводили до воды (две порции толуола – 3-5 минут, 96° этанол – 3 минуты, 80° этанол – 3 минуты, 70° этанол – 3 минуты, дистиллированная вода – 5 минут). Затем окрашивали гематоксилином 7-10 минут, промывали в дистиллированной воде 5 минут. Для побурения срезов дифференцировали в 1% соляной кислоты на 70° этаноле. Промывали дистиллированной водой, а затем слабым (0,5 %) раствором аммиака до посинения срезов. Окрашивали водным раствором эозина 0,5-1 минуту. Затем промывали в трех порциях дистиллированной воды для удаления избытка эозина. Удаляли воду из срезов в одной порции 70° этанола, двух порциях 96° этанола. Экспозиция в каждой

порции спирта – 2 минуты. Срезы просветляли в двух порциях карбол–ксилола (смесь расплавленного фенола и толуола в соотношении 1:4 или 1:5) – 1 минуту. Производили окончательное обезвоживание срезов в двух порциях толуола. Пребывание срезов 2 минуты. Заключали срезы в канадский бальзам или синтетическую среду для заключения гистологических срезов.

Для выявления культуры клеток, выращенных на амнионе, использовали ИГХ методики. Для «демаскирования» антигенов регидратированные срезы подвергали термической обработке в растворе Target Retrieval Solution (DAKO, Дания) с использованием микроволновой печи Samsung CE118KFR. После блокирования неспецифического связывания белков протеиновым блоком (DAKO) и эндогенной пероксидазной активности пероксидазным блоком (DAKO) наносили первичные антитела. Использовали мышинные моноклональные антитела (МАТ) к цитокератину 3/12 (клон AE5, Millipore, США), МАТ к p63 (клон 4A4, Diagnostic BioSystem (DBS), США), МАТ к цитокератину 19 (клон A53–B/A2.26, DBS). Визуализацию первичных антител проводили с помощью высокочувствительной полимерной системы детекции EnVision FLEX+ (DAKO). В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали DAB+ (DAKO). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Далее окрашенные срезы заключали в полусинтетическую среду Eukit (Kalk, Италия).

Морфология клеток аналогична в описанных выше колониях, мигрирующих по пластику. Предположительно, что коллективная миграция ЛСК, генерирующих из голоклонов, является универсальным механизмом эпителизации.

Часть образцов окрашивали на гематоксилин и эозин, другую часть по Романовскому-Гимзе следующим образом: перед окрашиванием разводили готовый жидкий краситель из расчета 1-2 капли красителя на 1 мл дистиллированной воды. Затем срезы, освобожденные от парафина, фиксировали в метиловом спирте, окрашивали раствором (1 мл готовой жидкой краски, добавляли 2 мл основного буферного раствора и 47 мл

дистиллированной воды) в течение 20-15 минут, ополаскивали в дистиллированной воде, высушивали.

Таким образом, до недавнего времени идентификация ЛСК в основном основывалась на общих свойствах СК: отсутствие дифференцировки, длительное сохранение метки (клоногенный анализ), неопределенная способность к пролиферации, а также особая роль в процессе заживления повреждений роговицы. Данные литературы и собственные наблюдения позволили определить список молекулярных маркеров, необходимых для определения свойств лимбального компартмента СК.

2.2.3. Оценка функциональных свойств

Для сравнения динамики роста и пролиферации ЛСК и КПЭ на стромальной стороне АМ и на стороне базальной мембраны проводили ММТ-анализ, описанный выше (2.1.3).

Для исследования использовали 24-х луночные планшеты («Costar», США), на дно которых помещали АМ размером 1см×1см так, чтобы субстрат плотно прилегал к поверхности пластика. По 10 образцов помещали стромальной стороной верх и стороной базальной мембраны. В каждую лунку добавляли по 1 мл ММТ в питательной среде с концентрацией 0,5 мг/мл и инкубировали после второго монослойного культивирования в течение двух часов в CO₂ инкубаторе («Joan», Франция) при 37°C и 5% содержании CO₂. 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.

Показано, что ММТ является интегральным индикатором клеточного метаболизма, так как восстановление происходит в митохондриях, цитозоле, эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране. Количество образовавшихся кристаллов формазана связываются с количеством

метаболически активных клеток в клеточной культуре и измеряется при $\lambda=570\text{nm}$ спектофотометрически.

2. 3. Методы статистической обработки полученных данных

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

При планировании экспериментальных исследований проводился расчет необходимого размера выборки при сравнении двух частот или двух средних. Данные, полученные в результате опытов, были проверены на нормальность. И в зависимости от того, подчинялись они нормальному закону распределения Гаусса, проводили дальнейший анализ собранной числовой информации. Для сравнения пролиферативной активности клеточных линий ЛСК и КПЭ использовали метод сравнения средних двух независимых выборок с исчислениями t -Стьюдента [11] с уровнем значимости не меньше 0,05.

ГЛАВА 3. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

В данной главе описаны результаты сравнительного изучения морфологических, пролиферативных и дифференцированных свойств ЛСК и КПЭ, выделенных из роговицы человека в процессе монослойного культивирования. При этом была предпринята попытка определить общие тенденции поведения клеток в культуре, а также отдельные особенности реализации их потенциала *in vitro* в зависимости от вида клеток.

Для изучения морфофункционального состояния клеток роговицы человека были проведены экспериментальные исследования *in vitro*. Получены из корнеосклерального кольца лимбальные клетки в процессе культивирования на разных пассажах подвергались иммуногистохимическому окрашиванию по описанной выше методике.

3.1. Морфофункциональное состояние лимбальных стволовых клеток роговицы

Культура лимбальных клеток (ЛК) роговицы получена методом эксплантов, описанным в главе «Материалы и методы». На 2-4 сутки культивирования наблюдалась активная миграция клеток из эксплантов и их распластывание (рис.3.1 А). При культивировании ЛК обладали выраженной адгезией и образовывали колонии. Морфологически 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. За 14 дней они производили от 20 до 50 тыс. мелких базальных камбиальных клеток с овальным несколько вытянутым ядром. Вторая группа представляла собой удлиненные клетки веретенообразной формы.

При появлении пролиферации ЛК (рис.3.1 Б) на 3-5 сутки при помощи инвертированного микроскопа осуществляли подсчет пролиферирующих клеток.

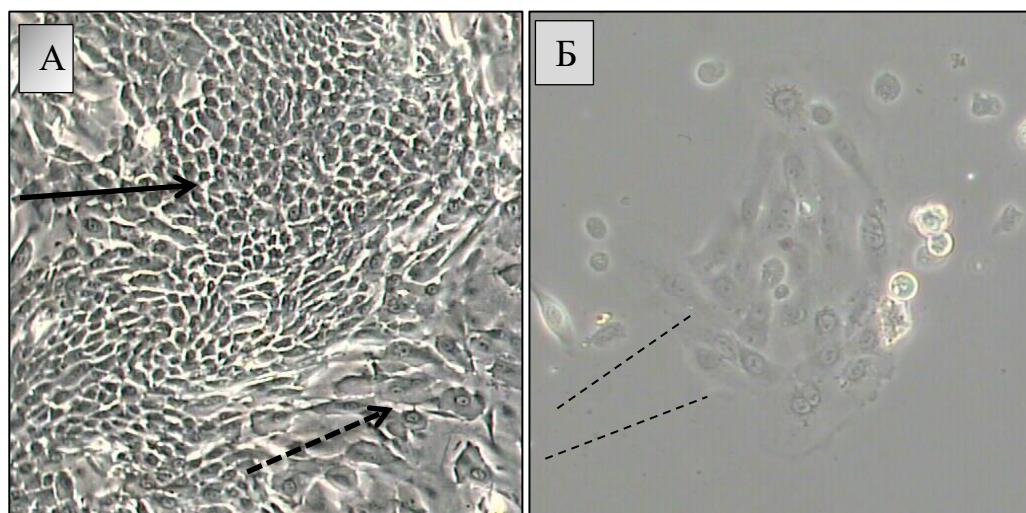


Рисунок 3.1. А - первичная культура лимбальных клеток, образование колонии из экспланта, клетки голоклона (черная стрелка), распластаные клетки (пунктирная стрелка). Б - образование колонии из единичных клеток. ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 10$.

Клетки подсчитывали в поле зрения микроскопа при 100-кратном увеличении, в качестве критерия, определяющего уровень подсчета, использовали поле зрения микроскопа.

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.

На 7-14 сутки культивирования *in vitro* на дне культурального флакона колонии клеток, пролиферирующие от эксплантов, сливались между собой, образуя монослой. Компактизованные клетки голоклонов плотно прилегали друг другу (рисунок 3.1 А - черная стрелка), по периферии их окружали хорошо распластанные клетки призматической формы, дважды превышающие их в размерах, обладающие вертикальной анизоморфией (рисунок 3.1 А – пунктирная стрелка). При пассировании клетки имели морфологическое строение сходное с эпителием.

По мере культивирования фибробластоподобные клетки занимали всю большую часть смешанной зоны вокруг экспланта (рисунок 3.2), а также активно мигрировали по поверхности культурального флакона. Вблизи материнских участков зона роста имела вид плотно упакованного в виде «потоков» и «завитков» монослоя фибробластоподобных клеток, среди которого выявлялись участки эпителиоподобных клеток, встречалось много клеток в состоянии митоза.

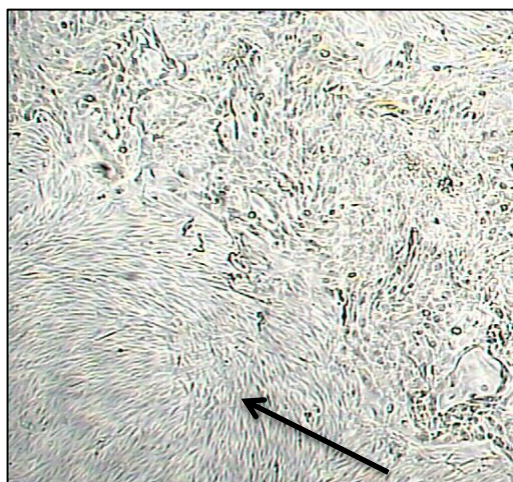


Рисунок 3.2. Первичная культура лимбальных клеток, 12-е сутки культивирования, фибробластоподобные клетки (черная стрелка). ФКМ, окуляр $\times 4$, объектив $\times 10$.

На ранних пассажах в культуре обнаруживались клетки экспрессирующие транскрипционный маркер стволовых/прогениторных клеток–p63. Положительное окрашивание ядер характерно для стволовых клеток лимба.

Увеличение относительного числа экспрессирующих p63 может свидетельствовать об обогащении культуры стволовыми клетками. Несомненно, они обладают высоким пролиферативным потенциалом. Следует отметить, что по мере культивирования на 12–16 пассажах экспрессия p63 снижалась, вероятно, это связано с тем, что стволовость сохраняется в культуре в течение 1,5 месяцев. Положительное окрашивание виментином–белком промежуточных филаментов подтвердило прогениторное происхождение клеток. (рисунок 3.3 А). На поздних пассажах позитивное окрашивание цитокератина 3/12 характерно для дифференцированных ЛСК (рисунок 3.3 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 удлинённой формой и круглым или удлинённым ядром с хорошо просматриваемым ядрышком (рисунок 3.3 А).

Из эпителиальных маркеров был выявлен цитокератин 19 (рисунок 3.3 В), окрашивающий базальные клетки лимба. Следует отметить, что экспрессия характерна для 80% клеток и одновременно с этим, более 95% клеток экспрессировали виментин (рисунок 3.3 А).

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

Исследуемые клетки не экспрессировали следующие маркеры: CD 34, α -SMA (альфа гладкомышечный актин), keratin sulfate.

По результатам окрашиваний наблюдалось плавное снижение экспрессии специфического белка ALDH3A1 в процессе культивирования лимбальных клеток: с 91% на втором пассаже и до 67,6 % на шестом соответственно (рисунок 3.3 Д, рисунок 3.4).

Можно предположить, что резкое снижение роговического кристаллина ALDH3A1 будет способствовать потере прозрачности роговицы.

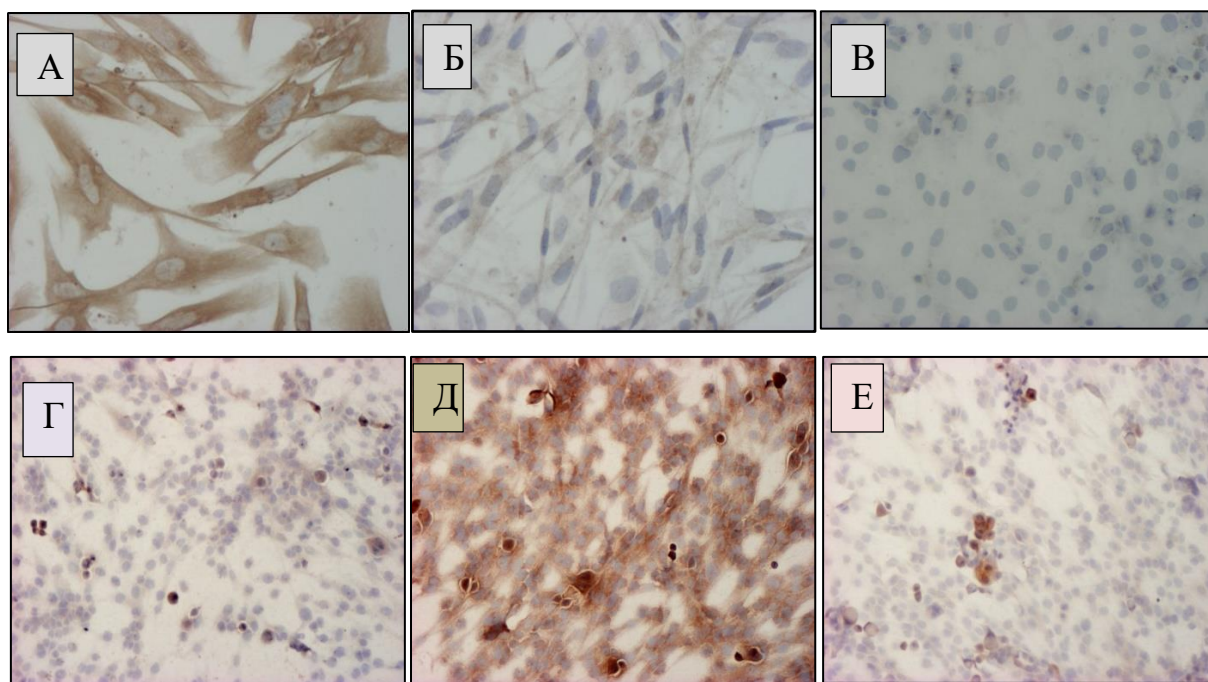


Рисунок 3.3. **А** - иммуногистохимическое позитивное окрашивание виментином ЛСК, неоднородность упаковки. **Б** - экспрессия цитокератина 3/12. ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 10$. **В** - иммуногистохимическое окрашивание ЦК 19. **Г** - Р63. **Д** - ALDH3A1. **Е** - CD 117. ФКМ, увеличение $\times 75$.

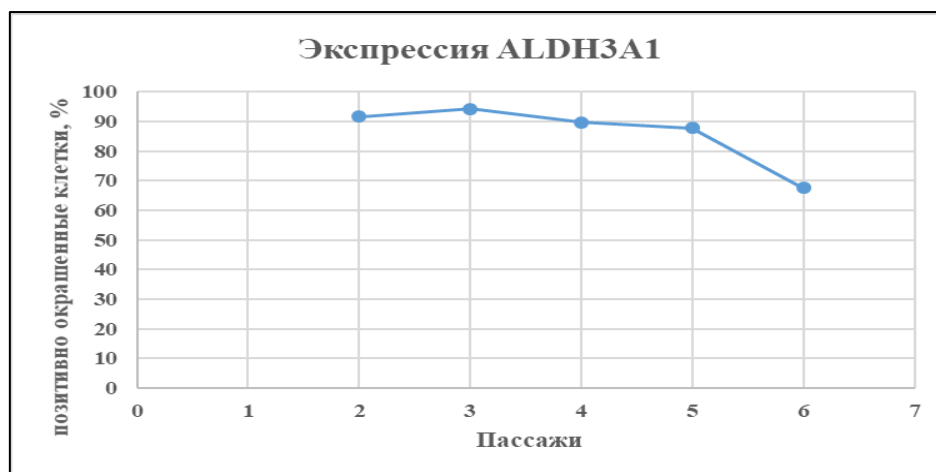


Рисунок 3.4. Экспрессия ALDH3A1.

Экспрессия ядерного маркера р63 с 0,85% к концу культивирования снизилась до 0,34 %, но к 5 пассажу наблюдался резкий подъем до 1,17 %. Некоторые исследователи утверждают, что стволовость в культуре лимбальных

клеток сохраняется в течение 1,5 месяцев культивирования *in vitro*. Предположим, что нестабильная экспрессия маркера стволовых клеток все же указывает на наличие высокого пролиферативного потенциала стволовых клеток (рисунок 3.5).



Рисунок 3.5. Экспрессия Р63.

Цитоплазматическое окрашивание CD 117 (рисунок 3.6) маркера клеток — предшественников с возрастанием пролиферации увеличивалось с 2,55 % до 10,89 %. Для 5 пассажа характерно резкое увеличение экспрессии до 26,06 %.



Рисунок 3.6. Экспрессия CD 117.

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 (рисунок 3.7).

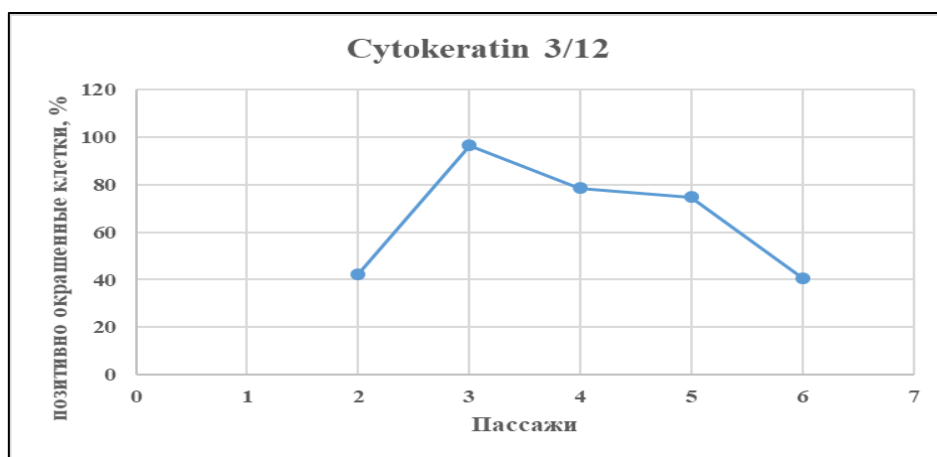


Рисунок 3.7. Экспрессия Cytokeratin 3/12.

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 (рисунок 3.8).

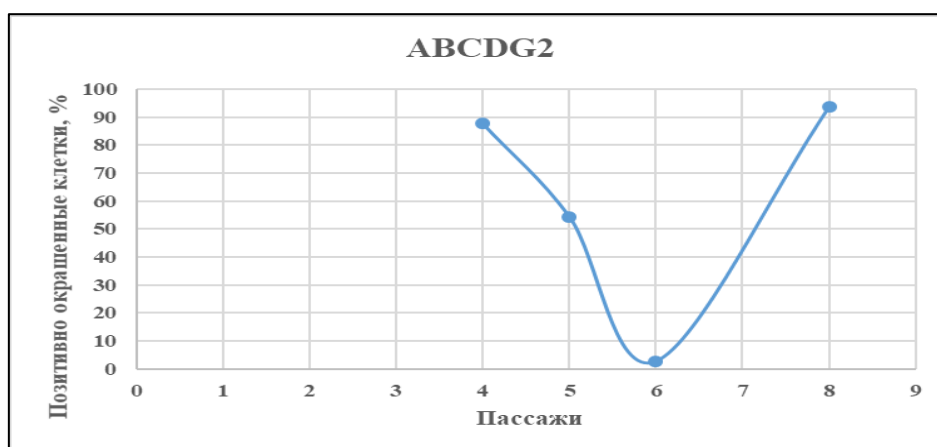


Рисунок 3.8. Экспрессия ABCDG2.

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.

На 4 пассаже характерна 96,19% экспрессии EGFR (рисунок 3.9), 5 пассаж и 6 характеризовался равномерно окрашиванием клеток соответственно 52,15% и 55,82% соответственно. Для 8 пассажа характерен подъем до 69,23%. Рецептор эпидермального фактора роста существует на поверхности клеток и активируется путем связывания его специфическими лигандами, стимулирует клеточный рост и клеточную дифференцировку эпителиального покрова.

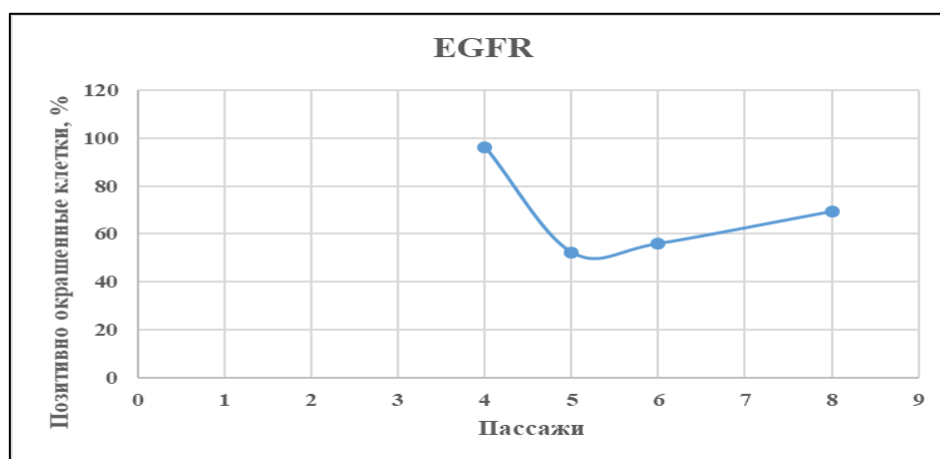


Рисунок 3.9. Экспрессия EGFR.

Экспрессия Ki67 (рисунок 3.10) 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%.

Экспрессия TGFb3 (рисунок 3.11) на четвертом пассаже составила 50,97% окрашенных клеток, на 5 пассаже составила 51,87, к 8 пассажу экспрессия снизилась до 19,81%.

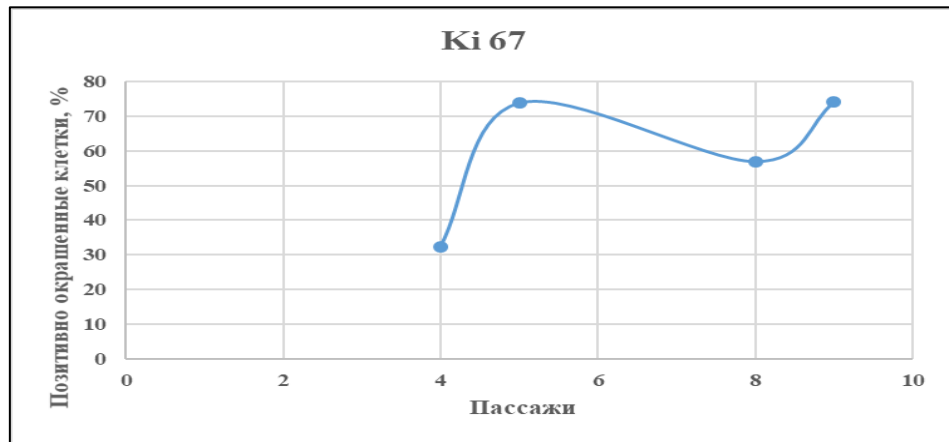


Рисунок 3.10. Экспрессия Ki67.

К девятому пассажу характерно увеличение экспрессии до 29,77%. Можно предположить, что высокое содержание TGFb3 свидетельствует о его наличии в цилиарных отростках, на клеточной поверхности и во неактивной форме внеклеточного матрикса. 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 экзогенные фибробласты.

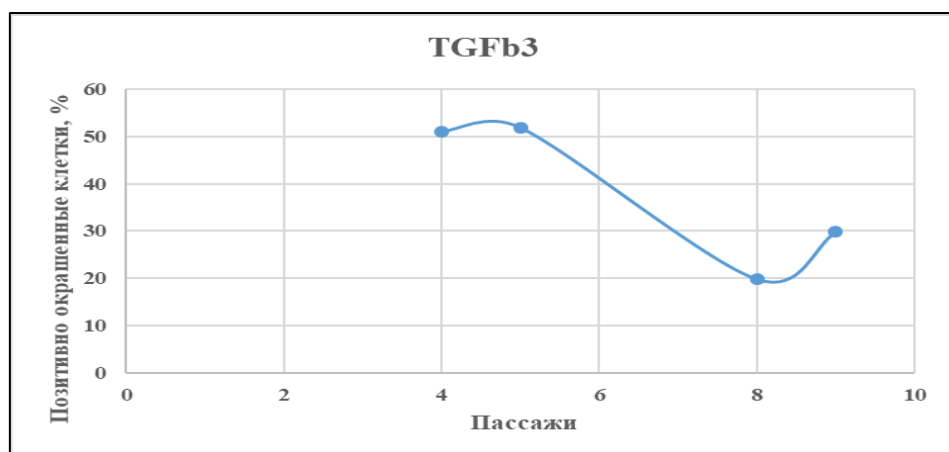


Рисунок 3.11. Экспрессия TGFb3.

Экспрессия Integrin $\beta 1$ (рисунок 3.12) 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 (рисунок 3.13) 73,89% и 75,81% соответственно, но к пятому пассажиру заметно снижение до 38,94%. Позитивно окрашенных клеток к шестому пассажиру наблюдали 55,65%.

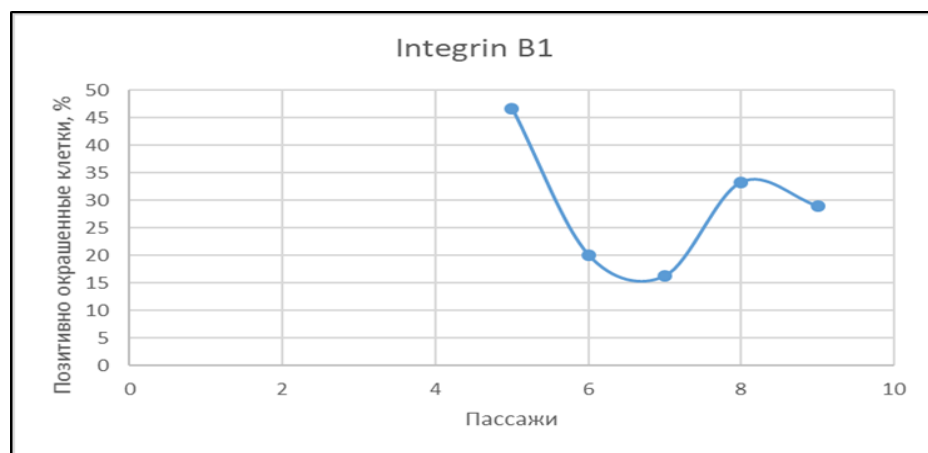


Рисунок 3.12. Экспрессия Integrin B1.

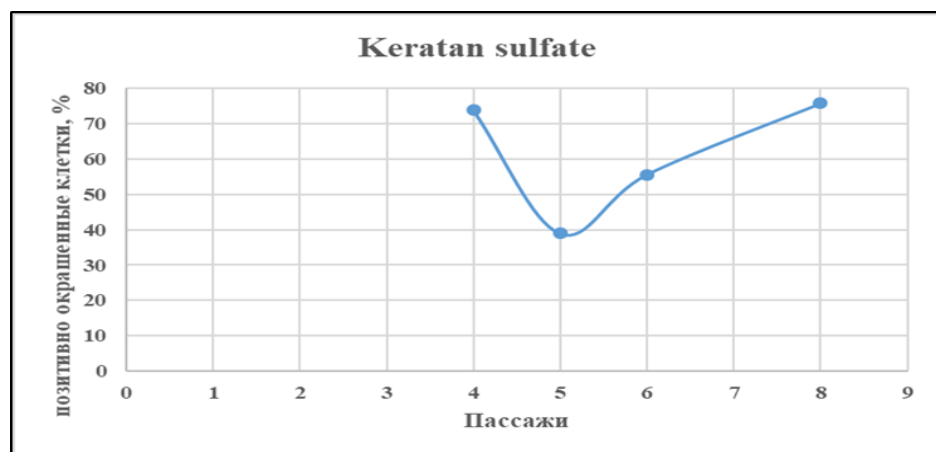


Рисунок 3.13. Экспрессия keratan sulfate.

В роговицы высокое содержание keratan sulfate, по-видимому, связано с поддержанием уровня гидратации ткани, критического для прозрачности роговицы. Keratan sulfate один из основных протеогликанов роговицы и обладает водосвязывающими свойствами.

Результаты, приведённые в настоящем разделе, свидетельствуют о том, что полученная культура ЛСК обладала высокой гетерогенностью, после достижения клетками голоклонов конфлюэнтного монослоя, преобладающими по морфологическим признакам являлись лимбальные клетки. Существование фибробластоподобных клеток в культуре доказывает наличие дифференцированных клеток.

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 Cytokeratin 3/12 указывает на дифференциальный потенциал в культуре. Пролиферирующие клетки находятся в базальном слое лимба, что подтверждено высокой экспрессией ALDH3A1, CD 117, CK 3/12 и низкой, по сравнению с предыдущими маркерами p63.

Следует отметить, что использованный в настоящей работе метод эксплантации является общепринятым для получения дермальных фибробластов. Ферментативные методы выделения клеток способны существенно влиять на свойства клеток.

3.2. Морфофункциональное состояние клеток плоского эпителия роговицы глаза человека

После механической и химической обработки эпителия роговицы, описанной выше в главе «Материалы и методы», получали клеточную суспензию КПЭ роговицы глаза человека, культивировали и проводили экспериментальные исследования.

Форма клеток была преимущественно три- и полигональная, для наиболее уплотненных 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.

Таким образом, гетерогенность КПЭ в первичной культуре была сильно выражена (рисунок 3.14).

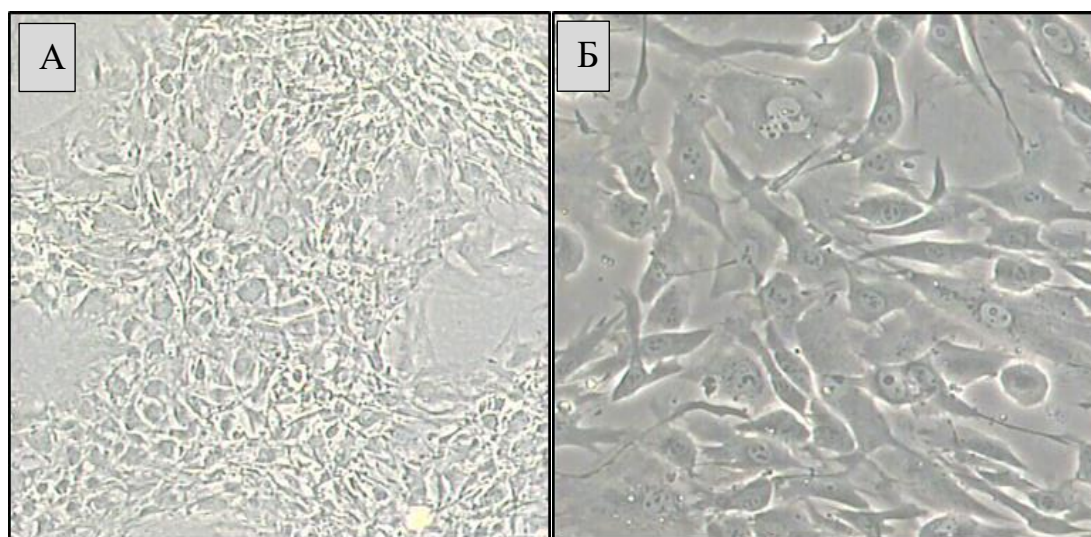


Рисунок 3.14. А - первичная культура КПЭ, 14-е сутки культивирования. ФКМ, окуляр $\times 4$, объектив $\times 10$. Б - 21-е сутки культивирования культуры КПЭ. ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 10$.

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, неправильную форму и неоднородную по плотности цитоплазму.

Пролиферативную активность и динамику роста культуры КПЭ оценивали с использованием следующих методов: определения времени удвоения популяции при культивировании клеток в течение нескольких пассажей в лунках 6-ти луночного планшета на 1-е и 5-е сутки культивирования при одинаковой плотности посева ($10^4/\text{см}^2$), использования прямого подсчета количества клеток и иммуногистохимии.

Динамическая природа виментина (рисунок 3.15) важна для формы клетки. Принято считать, что виментин обеспечивает целостность клеток и их устойчивость к механическим воздействиям, участвует во взаимодействиях разных систем цитоскелета.

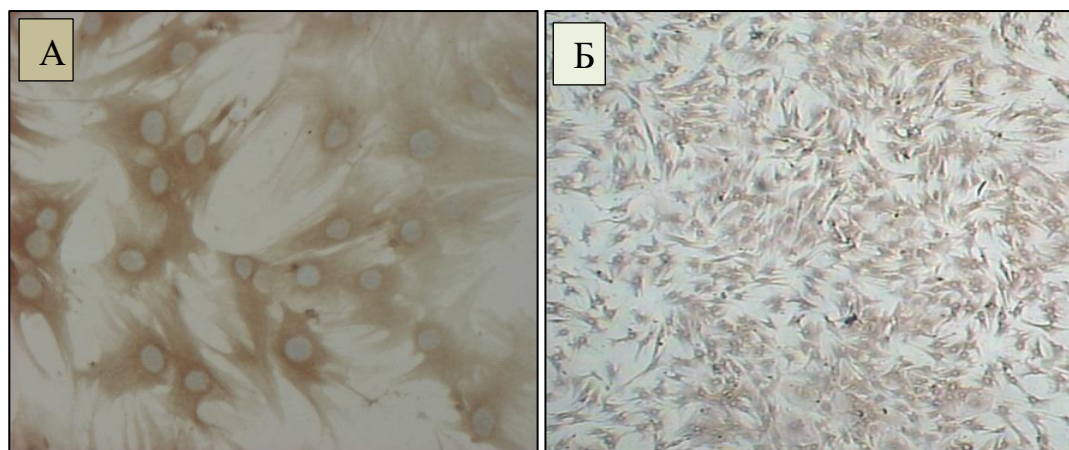


Рисунок 3.15. А - иммуногистохимическое окрашивания первичной культуры КПЭ на виментин. ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 10$. Б - окрашивание пан-цитокератином КПЭ. ФКМ, окуляр $\times 4$, объектив $\times 10$.

Виментин играет важную роль в поддержании органелл в цитоплазме, обеспечивает прочность клетки и устойчивость к механическому стрессу, управляет транспортом липопротеинов малой плотности, формирует клетку вокруг агрегируемого белка. При уменьшении виментина клетки становятся чувствительны к механическому повреждению.

Следовательно, различия в пролиферативной активности исследованных культур могут быть связаны со степенью детерминированности клеток, входящих в состав исследованных культур, а также функциональными особенностями источников *in vivo*. ЛСК обладают высоким пролиферативным потенциалом и способностью к самообновлению.

Таким образом, лимбальной зоне принадлежит важная роль как источнику новых клеток при посттравматической регенерации эпителия, так и барьеру, препятствующему прорастанию конъюнктивального эпителия на деэпителизованную, обнаженную поверхность роговицы. Эпителий лимбальной зоны и передний эпителий роговицы характеризуются как единая тканевая система, содержащая камбиальные элементы, дифференцирующиеся и дифференцированные эпителиоциты ткани, выполняющей покровную и защитную функции.

3.3. Морфофункциональное состояние амниотической мембраны

Для экспериментального исследования криозамороженную амниотическую мембрану 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.

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 (рисунок 3.16).

По данным сканирующего электронного микроскопа JEM 100С (JEOL Япония) поверхность АМ интактная (рисунок 3.17). Выраженных признаков повреждения клеток АМ после размораживания не было отмечено (рисунок 3.18).

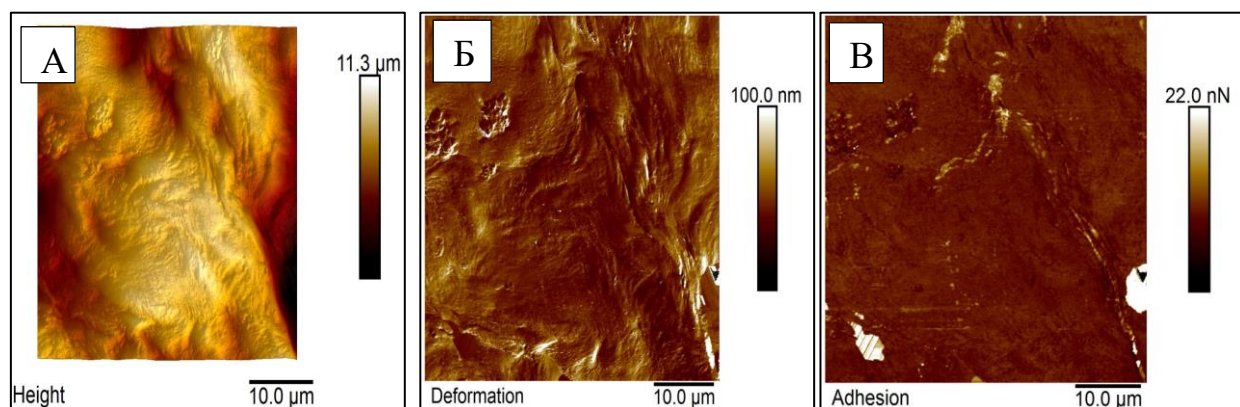


Рисунок 3.16. Высушенная АМ в воздухе, разрешение 512×512 точек, скорость сканирования 0.2 Гц. Наномеханические свойства: высота (А), деформация (Б), адгезия (В).

Степень адгезии и распластывание ЛСК на субстрате оценивали с использованием электронной микроскопии. Клетки характеризовались округлой формой, их поверхность была сравнительно гладкой, содержащей различное количество мелких везикул. Выраженных повреждений клеток после консервирования не было отмечено (рисунок 3.18).

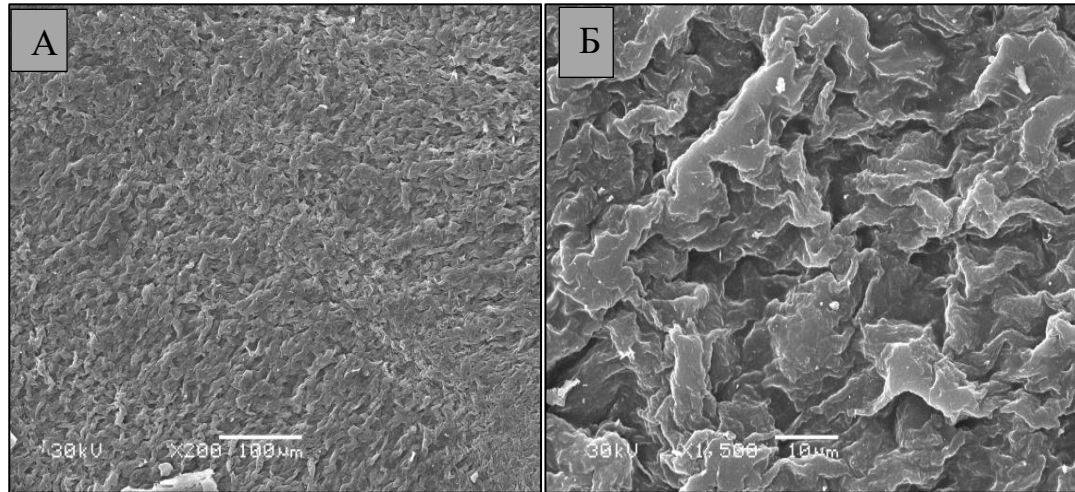


Рисунок 3.17. Стромальная сторона АМ. СЭМ. Увеличение $\times 200$ (А),
увеличение $\times 1,500$ (Б).

Как было показано в работе [168], 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.

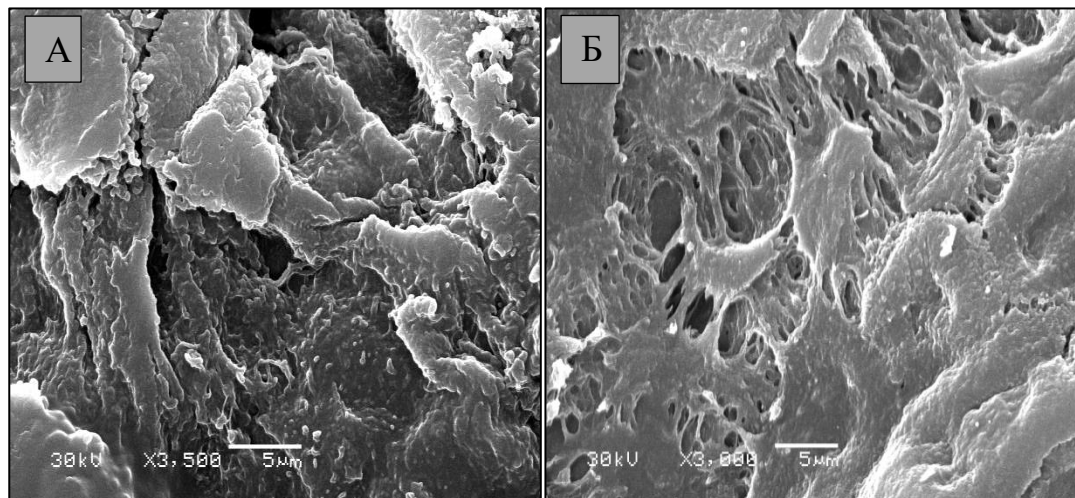


Рисунок 3.18. ЛСК, 1-е часы после размораживания
криоконсервированной АМ с культивированными ЛСК и КПЭ
(криоконсервация $t = -196^{\circ}\text{C}$), СЭМ: А- поверхность базальной мембраны , Б-
поверхность стромальной стороны, увеличение $\times 1,500$.

Фундаментальным свойством клеток является способность к прикреплению и распластыванию по поверхности матрикса [207]. 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 переориентировка 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.

Таким образом, в работе показана патогенетически-обоснованная методика 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.

ГЛАВА 4. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ НА ПОВЕРХНОСТИ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

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

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, генерирующих из голоклонов является универсальным механизмом эпителизации.

В первые сутки культивирования наблюдались клетки округлой или полигональной формы с небольшими отростками. При монослойном культивировании (рисунок 4.1) происходила постепенная очистка культуры от слабоадгезивных клеток, и на 3-е сутки наблюдался более равномерный рост клеток по всей поверхности АМ. На 3-е сутки многослойного культивирования осуществляли оценку пролиферативной активности растущих культур при помощи МТТ-анализа.

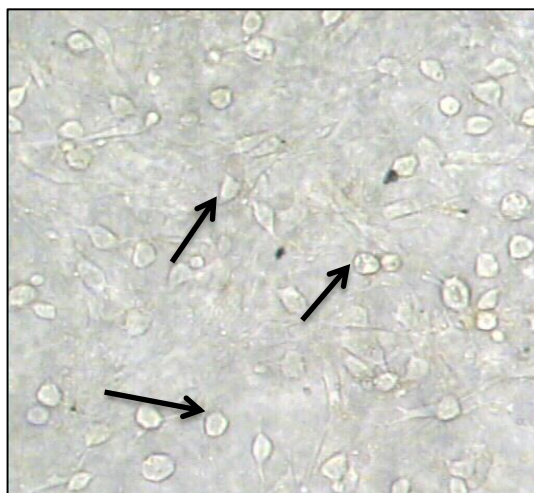


Рисунок 4.1. Третьи сутки культивирования ЛСК (клетки отмечены черной стрелкой) на стромальной стороне АМ. ФКМ. Окуляр $\times 20$, объектив $\times 10$.

Согласно таблицы 4.1 показано, что пролиферативная активность лимбальных стволовых клеток в экспериментальной группе была в 1,08 раза больше на 2 сутки и в 1,15 раза больше на 3 сутки.

Таблица 4.1 Пролиферативная активность ЛСК на стромальной 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	$1,31 \pm 3,4$	$1,71 \pm 4,1$	$2,13 \pm 4,9$
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 $p < 0,05$.

На окрашенных гематоксилином и эозином препаратах видно (рисунок 4.2 А, Б), как прикрепившиеся к субстрату клетки, основной своей частью, включая ядро, располагаются во втором слое пласта, контактируя своей базальной поверхностью с такими же следующими за ними клетками.

Согласно гистологическому анализу окраски по Романовскому (рисунок 4.2 В, Г), АМ окрасилась в сиреневый цвет, а культивированные на поверхности клетки – в синий цвет. Можно предположить, что использование пассивированных клеток способствует более эффективному взаимодействию с субстратом.

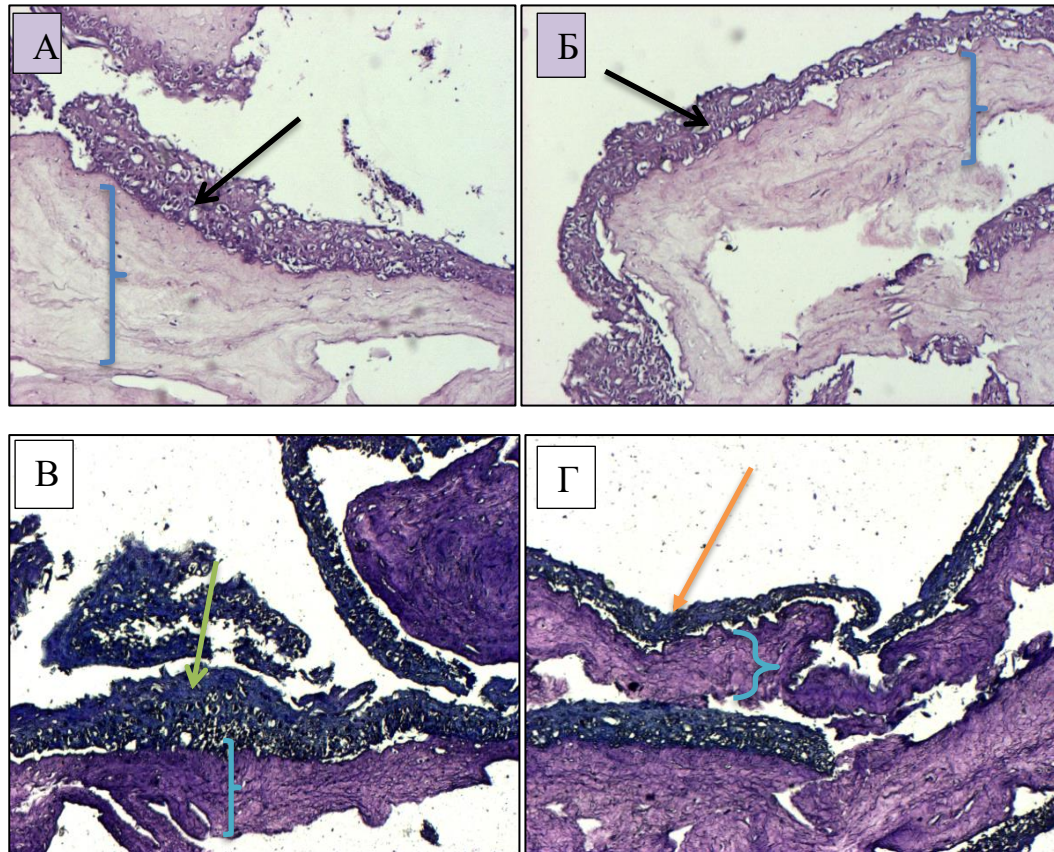


Рисунок 4.2. Окраска гематоксилином и эозином: **А** - культивированные ЛСК и КПЭ (черная стрелка) на поверхности стромальной стороны АМ (голубая скобка). ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 3,5$. **Б** - культивированные ЛСК и КПЭ (черная стрелка) на базальной стороне АМ (голубая скобка). ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4,5$. **В** - гистопрепараты окрашенные по Романовскому-Гимзе. Культивированные ЛСК и КПЭ (зеленая стрелка) на стромальной стороне АМ (голубая скобка). **Г** - культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая стрелка) на базальной стороне АМ (голубая скобка). ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 3,5$.

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

4.2. Морфофункциональное состояние клеточного состава клеток 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 (рисунок 4.3).

При микроскопии клеточные монослои ЛСК и КПЭ роговицы на гистологических препаратах не дифференцировались.



Рисунок 4.3. Третьи сутки культивирования КПЭ (клетки отмечены черной стрелкой) на стромальной стороне АМ. ФКМ, окуляр $\times 20$, объектив $\times 10$.

Для базальных лимбальных клеток характерна цилиндрическая форма, среди этих клеток большое количество камбиальных, 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, расположенных параллельно поверхности пласта. В таблице 4.2 представлены сводные данные пролиферативной активности КПЭ контрольной и первой группы.

На 4-е сутки многослойного культивирования осуществляли оценку пролиферативной активности растущих культуры КПЭ при помощи МТТ – анализа.

Из таблицы 4.2 видно, что пролиферативная активность на 2-е сутки больше в 1,02 раза, а на 3 сутки в 1,12 раза.

Таблица 4.2 Проллиферативная активность КПЭ на стромальной 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	$1,19 \pm 0,045$	$1,39 \pm 0,029$	$1,89 \pm 0,041$
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 $p < 0,05$.

4.3. Морфофункциональное состояние лимбальных стволовых клеток роговицы на базальной стороне амниотической мембраны

Культивирование ЛСК на базальной стороне АМ осуществлялось так же как культивирование на стромальной стороне. На 4-е сутки многослойного культивирования осуществляли оценку пролиферативной активности культуры ЛСК при помощи МТТ-анализа.

Из таблицы 4.3 видно, что особых различий в процессе культивирования на базальной стороне ЛСК не наблюдалось по сравнению с пролиферативной активностью ЛСК, культивированных на стромальной стороне АМ.

Таблица 4.3 Проллиферативная активность ЛСК 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	$1,27 \pm 2,6$	$1,7 \pm 3,9$	$2,4 \pm 3,1$
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 $p < 0,05$.

4.4. Морфофункциональное состояние клеток плоского эпителия роговицы на базальной стороне амниотической мембране

На 4-е сутки многослойного культивирования осуществляли оценку пролиферативной активности культуры КПЭ при помощи МТТ-анализа.

Таблица 4.4 Проллиферативная 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 $p < 0,05$.

Анализ полученных результатов исследований (рисунок 4.4, рисунок 4.5, рисунок 4.6) и данные культивирования ЛСК и КПЭ на стромальной стороне (таблица 4.1, 4.2) и базальной мембране АМ (таблица 4.3, 4.4) показал, что достоверных различий не отмечалось.

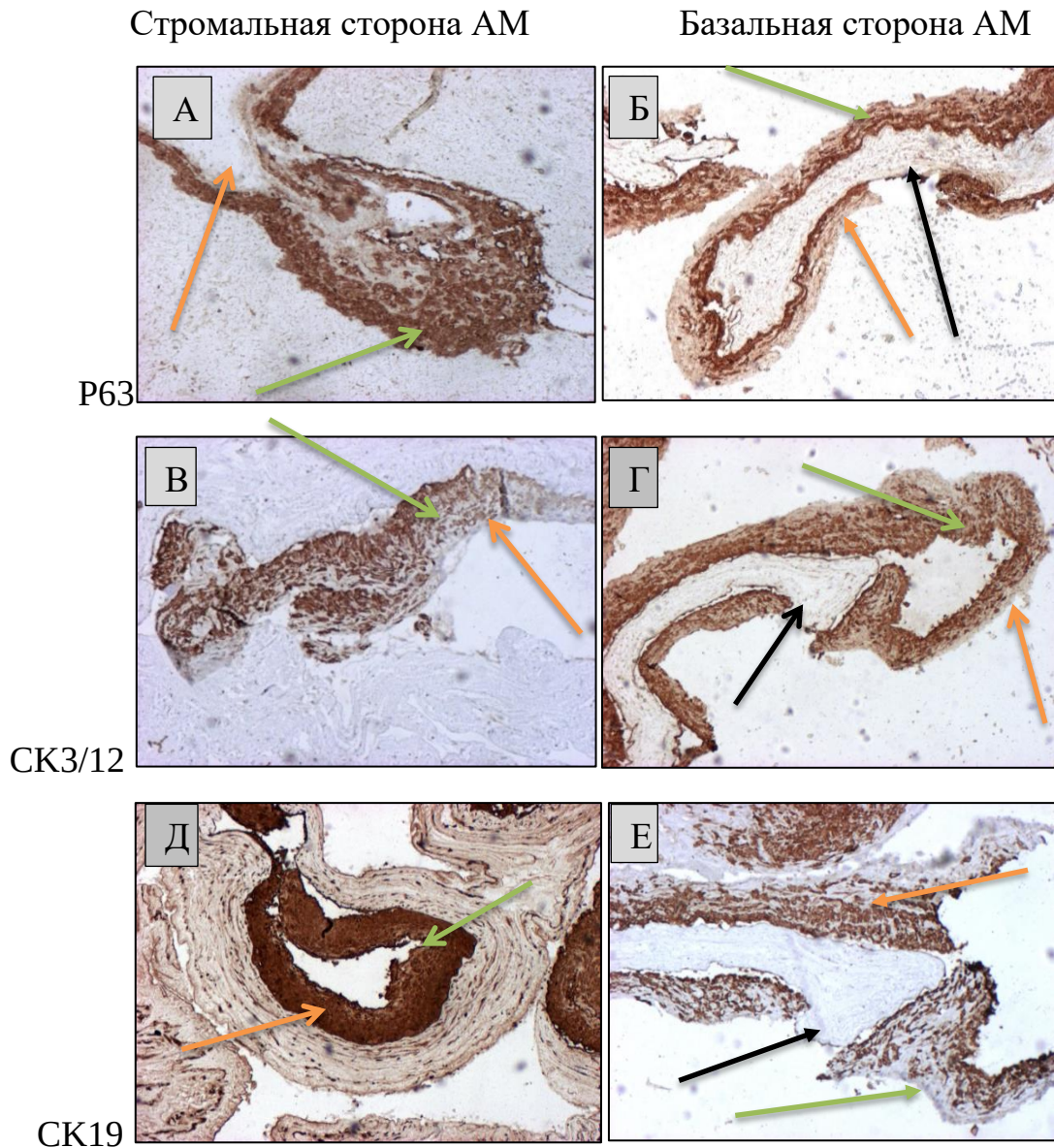


Рисунок 4.4. ИГХ. А - p63: культивирование ЛСК (зеленая стрелка) и КПЭ (оранжевая стрелка) на стромальной стороне АМ. Б - ЛСК (зеленая стрелка) и КПЭ (оранжевая стрелка) на базальной стороне (черная стрелка) АМ. В – цитокератин 3/12: ЛСК (зеленая стрелка) и КПЭ (оранжевая стрелка) на стромальной стороне АМ. Г - ЛСК (зеленая стрелка) и КПЭ (оранжевая стрелка) на базальной стороне АМ (черная стрелка). Д – цитокератин 19: ЛСК и КПЭ на стромальной стороне АМ. Е - ЛСК (зеленая стрелка) и КПЭ (оранжевая стрелка) на базальной стороне АМ (черная стрелка), ФКМ, окуляр $\times 10$, объектив $\times 3$.

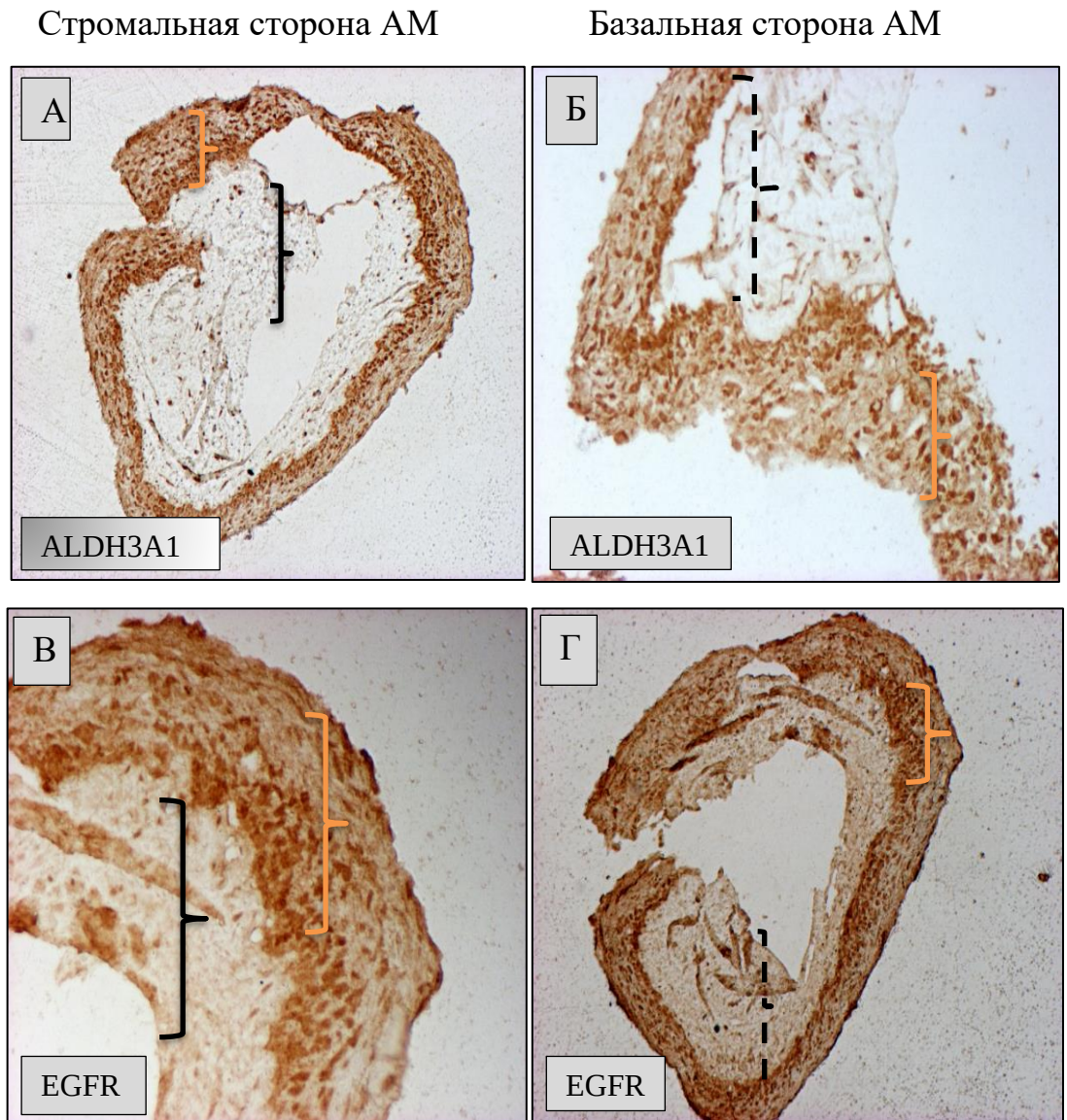


Рисунок 4.5. Иммуногистохимическое окрашивание: **А** - ALDH3A1. Культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая скобка) на стромальной стороне (черная скобка) АМ. ФКМ, увеличение $\times 40$. **Б** - культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая стрелка) на базальной стороне (пунктирная черная скобка) АМ, увеличение $\times 75$. Иммуногистохимическое окрашивание: **В** – EGFR. Культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая скобка) на стромальной стороне АМ (черная скобка), увеличение $\times 112$. **Г** - культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая скобка) на базальной стороне АМ (пунктирная черная скобка), ФКМ, увеличение $\times 45$.

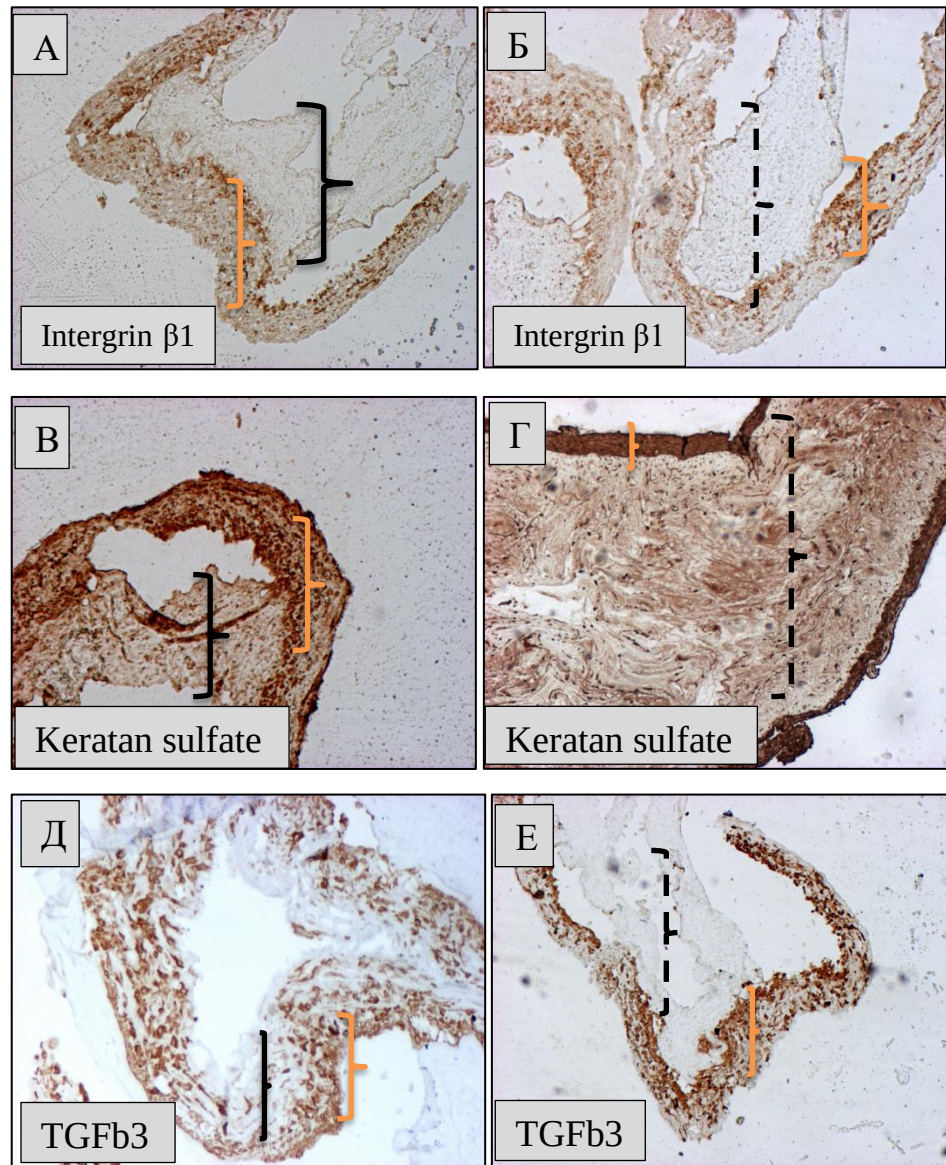


Рисунок 4.6. ИГХ. Intergrin $\beta 1$: **А** - культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая скобка) на стромальной стороне АМ (черная скобка), увеличение $\times 45$. **Б** - культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая скобка) на базальной стороне АМ (черная пунктирная скобка). ФКМ, увеличение $\times 60$. Keratan sulfate: **В** - культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая скобка) на стромальной стороне АМ (черная скобка). ФКМ, увеличение $\times 60$. **Г** - культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая скобка) на базальной стороне АМ (черная пунктирная скобка). ФКМ, увеличение $\times 30$. TGF $\beta 3$: **Д** - культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая скобка) на стромальной стороне АМ (черная скобка), увеличение $\times 75$. **Е** - культивированные ЛСК и КПЭ (оранжевая скобка) на базальной стороне АМ (черная пунктирная скобка). ФКМ, увеличение $\times 37$.

При анализе гистологических препаратов было установлено, что при одинаковом количестве посева лимбальных клеток на поверхность АМ статистически достоверных различий не было выявлено. Базальная и стромальная сторона АМ после двойного криохранения не выявила потерю адгезивных свойств и обладала способностью к пролиферации клеток роговицы глаза.

Культивированные клетки роговицы взаимодействовали с поверхностью АМ и скорость пролиферации на поверхности стромальной и базальной сторон амниона отличалась от культивирования на поверхности пластика. На общую клеточность влияет содержание сыворотки и ряда ростовых факторов роста, находящихся в питательной среде.

Положительная экспрессия предполагаемого маркера стволовых клеток р63 в культивируемых клетках роговицы на поверхности АМ, вероятно, указывает на наличие базальных ЛСК роговицы в культуре. Можно предположить, что маркеры дифференцировки СК 19 и СК3/12 подтверждают наличие ЛСК. Экспрессия роговичного кристаллина роговицы ALDH3A1 в культивируемых клетках указывает на возможную роль клеток в клеточной пролиферации. Наличие высокой экспрессии эпидермального фактора роста EGFR в культивируемых клетках роговицы, вероятно, указывает на участие в стимуляции клеточного роста и клеточной дифференцировки эпителиальных клетках роговицы. Экспрессия фактора роста семейства TGF указывает на то, что он является ключевым медиатором фиброза. TGF β 3 стимулирует эпителиально-мезенхимальный переход клеток эпителия роговицы.

Возможно, наличие Integrin1 в экспрессируемых клетках указывает на связывание монослоев ЛСК и КПЭ в культивировании на поверхности АМ. Интегрины принимают участие во взаимодействии клеток с белками ВКМ и другими клетками на поверхности субстрата.

Таким образом, для идентификации на поверхности АМ культивируемых клеток использовали те же маркеры, что и для идентификации на культуральном пластике в монокультуре.

4.5. Криоконсервирование лимбальных стволовых клеток и клеток плоского эпителия роговицы на поверхности амниотической мембраны

Получение культур ЛСК и КПЭ для экспериментальных целей, как правило, включает ряд этапов. Таких как: накопление клеточного материала, определение его безопасности (отсутствие патогенных вирусов и бактерий), транспортировка и др. Для проведения данных этапов необходимо сохранить биологические свойства клеток в течение длительного времени, что достигается путем криоконсервирования биологических объектов и их низкотемпературного хранения. Для криоконсервирования ЛСК и КПЭ, также как для мезенхимальных стволовых клеток и ряда других типов соматических клеток, широко применяется так называемый «общепринятый» (conventional) метод криоконсервирования [78, 135, 221].

Этот метод включает замораживание со скоростью 1°C/мин до –80°C с последующим погружением в жидкий азот или без погружения в азот. В качестве криопротектора наиболее часто используют диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации 5-10%. Кроме того, в состав криозащитной среды обычно входит сыворотка различного происхождения. Недавние исследования, проведенные Whaley et al. [213], подтвердили, что использование 10% ДМСО, 20% ЭТС для криоконсервирования МСК не влияют на жизнеспособность, пролиферативную активность, дифференцировочный потенциал и иммунофенотип после отогрева. Те же авторы показали, что криоконсервирование с использованием приведенного раствора не оказывает влияния на морфофункциональные свойства МСК, выделенных из кордовой крови взрослого человека [88]. Результаты работы Петренко Ю.А. [41] подтверждают данные о том, что общепринятый метод криоконсервирования может быть успешно применен не только для долгосрочного хранения МСК костного мозга, но и полученных из других источников, таких как дерма и жировая ткань.

Эффективность криоконсервирования обычно оценивают по уровню жизнеспособности и функциональной активности клеток после возвращения в физиологические условия.

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. Образцы хранили при –196°C в течение 4-6 месяцев. После размораживания и удаления криопротектора проводили иммуногистохимические исследования.

В настоящее время криоконсервирование, адгезировавших к субстрату ЛСК и КПЭ и созданных на этой основе объёмных биоинженерных структур, является неизученной задачей современной криобиологии. Кроме того, неисследованными остаются вопросы, связанные с влиянием криоконсервирования на прикрепленные клетки в зависимости от степени их адгезии и распластывания на субстрате или наличия межклеточных контактов.

Детальный анализ изменений морфологии клеток до и после криоконсервирования проводили на инвертированном лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 550 META (Carl Zeiss, Германия) (рис.4.7) с использованием программного обеспечения LSM 510 ver. 4.2 (Carl Zeiss, Германия). На рисунке черной стрелкой отмечены клетки, сползающие с поверхности АМ в первые 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 системы.

После криоконсервирования количество сохранных и жизнеспособных СК во многом зависит от метода выделения и использованного криопротектора.

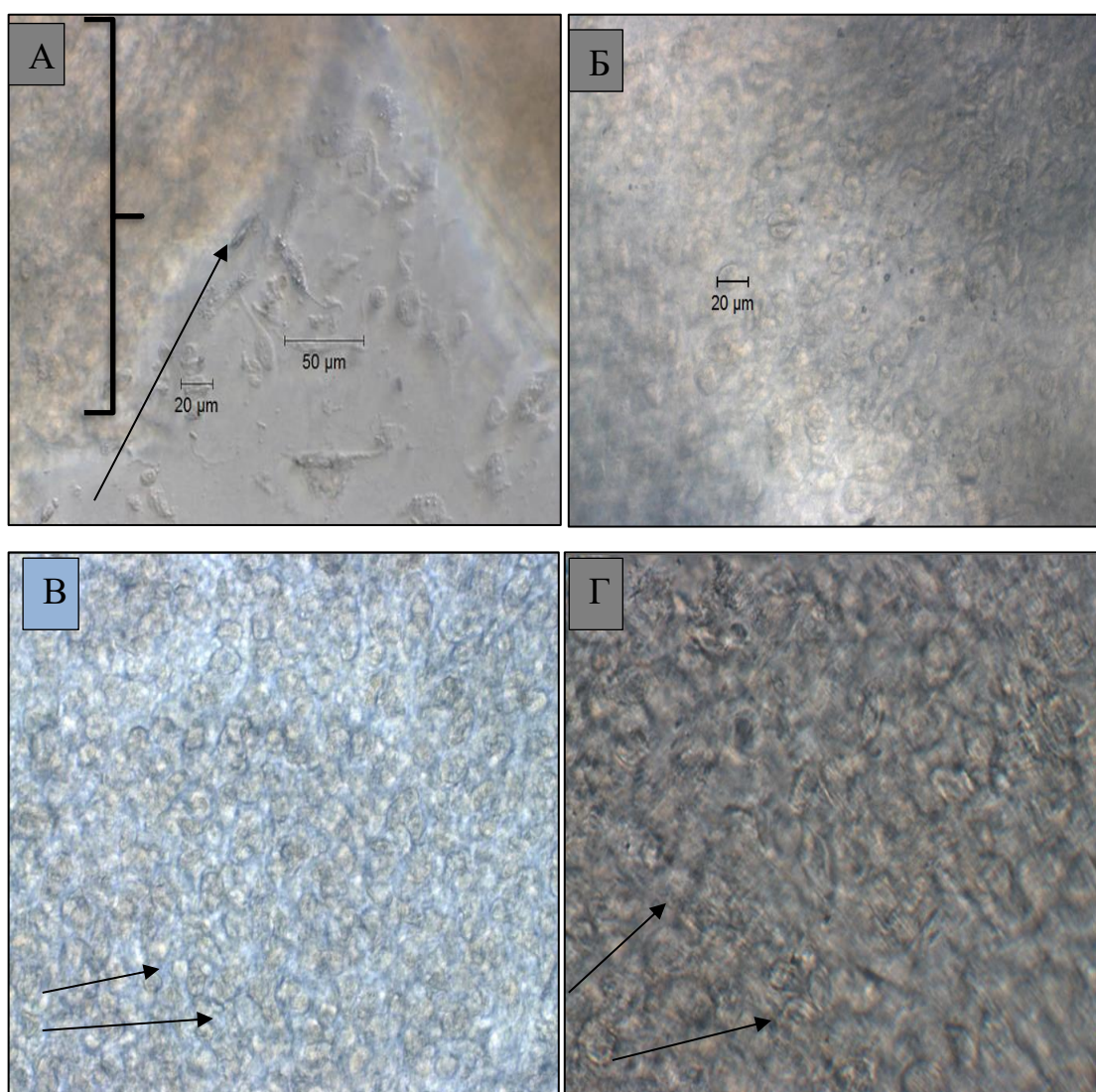


Рисунок 4.7. А, Б, В, Г - микрофотографии культивированных монослоев ЛСК и КПЭ (черная стрелка) на поверхности АМ (черная скобка), лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM 550 META.

Таким образом, в работе показана патогенетически-обоснованная возможность криоконсервации АМ с культивированными монослоями ЛСК и КПЭ с использованием медленного двухступенчатого замораживания в среде, содержащей 10% ДМСО и 20% ЭТС, что позволяет в значительной степени, без

существенной потери сохранить клетки, их общебиологические и специфические морфофункциональные свойства и потенциал. Сыворотка, присутствующая в криозащитной среде, оказывает позитивное многофакторное действие: способствует стабилизации биомембран, выравнивает осмотическое и онкотическое давление. Это способствует повышению жизнеспособности клеток после криоконсервации.

Результаты данного фрагмента работы демонстрируют перспективность использования патогенетически-обоснованной методики многослойного культивирования ЛСК и КПЭ на поверхности АМ в дальнейшем предназначенных для экспериментальных и клинических целей.

4.6. Оценка функционального состояния послойного культивирования лимбальных стволовых клеток и клеток плоского эпителия на стромальной стороне и базальной стороне амниотической мембране

Визуализацию клеточных линий ЛСК и КПЭ, а именно миграцию и пролиферацию, наблюдали с помощью прижизненной окраски RKN67 Green (рисунок 4.8).

Исходя из незначительных различий показателей пролиферативной активности, можно свидетельствовать о целесообразности использования для культивирования различных линий обеих сторон амниона.

При сравнительном анализе культивирования клеточных линий на культуральном пластике, в монокультуре, на базальной мембране и стромальной стороне амниона не наблюдалось изменения в морфологии культивированных клеточных линий и в морфологии самого субстрата (рисунок 4.9).

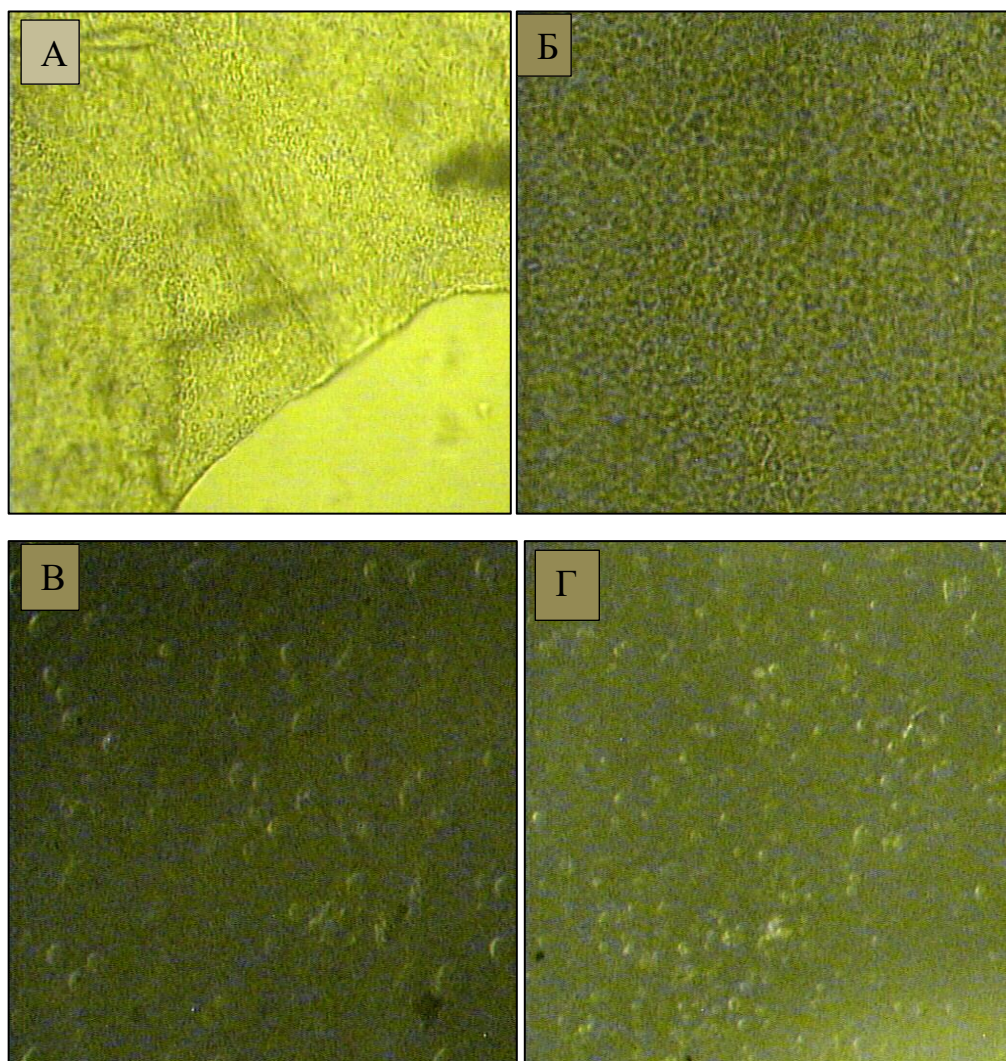


Рисунок 4.8. **А** - прижизненная окраска РКН67 АМ базальная сторона. ФКМ, увеличение $\times 10$, окуляр $\times 4$. **Б** - окраска РКН67 АМ базальная сторона. ФКМ, увеличение $\times 10$, окуляр $\times 10$. **В** - окраска РКН67 ЛСК на поверхности стромальной стороны АМ. ФКМ, увеличение $\times 10$, окуляр $\times 20$. **Г** - Окраска РКН67 КПЭ на поверхности стромальной стороны АМ. ФКМ, увеличение $\times 10$, окуляр $\times 20$.

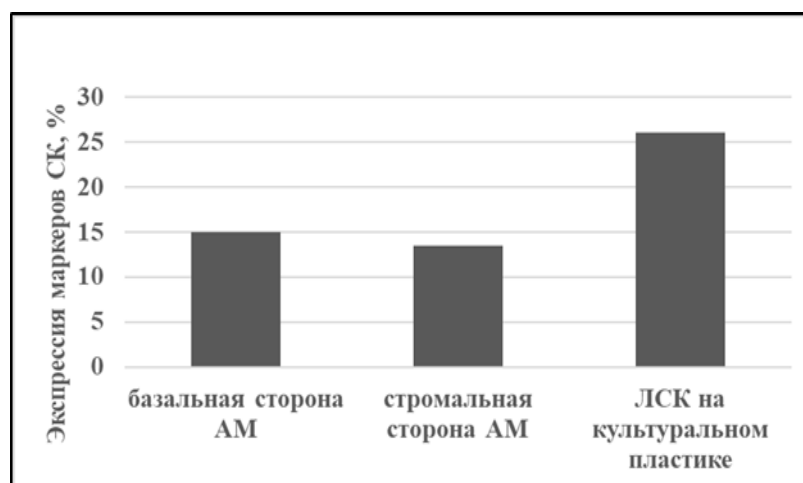


Рисунок 4.9. Экспрессия предполагаемых маркеров стволовых клеток P63, CD117, Ki67 на базальной стороне АМ и стромальной стороне АМ и ЛК на культуральном пластике.

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

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.

Таким образом, приведённые данные результатов исследований позволяют проследить общую тенденцию СК и эпителиальных клеток в первичных культурах ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека. Культивирование первичных культур ЛСК и КПЭ на пластике можно рассматривать с высокой миграцией и пролиферацией, но для культивирования на поверхности АМ с дальнейшей криоконсервацией, необходимы дополнительные исследования для определения жизнеспособных клеток из сохранившихся после процесса криоконсервации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие регенеративной медицины связано с внедрением в офтальмохирургию методов клеточной терапии для лечения ряда дегенеративных заболеваний патологии глаза.

Достижения в области регенеративной медицины и клеточной терапии основываются на уникальных свойствах СК, находящихся в базальном эпителии на корнеосклеральном лимбе, включая их способность к самообновлению и возможность дифференцировки в клетки эпителия роговицы и конъюнктивы, что является основанием для их применения в регенерации поврежденной роговицы.

Тканевая инженерия направлена на создание биоинженерных конструкций, состоящих из культивированных СК в составе искусственного (биологического или синтетического) матрикса с последующей пересадкой с целью замещения биологических функций пораженного участка ткани. Кроме того, данное направление нацелено на разработку эффективных концепций трансплантации, достижения максимальной совместимости, нетоксичности и полной деградации искусственных компонентов после трансплантации.

Впервые исследователями было описано нахождение мезенхимальных стволовых/ прогениторных клеток в глубоких слоях лимба в 2004 г. Доказано, что они обладают фенотипом, сходным с МСК костного мозга. Эти клетки не несут на своей поверхности антигенов HLA-DR, отвечают за процессы самоподдержания пула эпителиальных стволовых клеток, физиологической и репаративной регенерации роговицы благодаря своим секреторным свойствам и межклеточным контактам.

Одним из важных условий создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека является правильный выбор источника и типа клеток, для создания тканеспецифичного микроокружения. Многочисленные результаты исследований последних лет позволяют полагать, что такими клетками являются лимбальные эпителиальные стволовые клетки роговицы глаза человека.

Для поддержания роста и дифференцировки клеток в процессе культивирования, а в дальнейшем и реконструкции поврежденного эпителия, необходим специальный носитель клеток – субстрат. Поверхностные физико-химические характеристики биоинженерного материала определяют его адгезивные свойства и способность белков и клеток взаимодействовать с ним.

В работе ЛСК были выделены из лимбального трансплантата со всей окружности лимба цельного энуклеированного глаза. При выборе источника основывались на перспективе применения этих клеток и создания на их основе биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека с целью дальнейшей трансплантации.

На общую клеточность ЛСК, скорость пролиферации и морфологию клеточных культур может влиять концентрация сыворотки, глюкозы в культуральной среде, наличие глутамина и основного фактора роста фибробластов (bFGF), эпидермального фактора роста (EGF), аскорбиновой кислоты, инсулина, изопротеринола, гидрокортизона, трансферрина, плотность посева клеток, качество поверхности пластика, а также возраст донора и стадия заболевания.

Вклад криобиологии в тканевую инженерию весьма значителен и до настоящего времени не определен.

Криоконсервированные СК пациентов могут в достаточном количестве продолжительно храниться в криобанке для повторного или многократного введения своего депозита. Не исключено криохранение субстратов различных типов с культивированными клетками. Такой дальновидный подход к созданию биоконструкций обеспечит мультифункциональность.

Криобиологическая часть работы состояла в возможности обеспечить общепринятый метод криоконсервирования для МСК, включающий ступенчатое программное замораживание под защитой 10% ДМСО, сохранение специфических свойств ЛСК и КПЭ.

Криоконсервированная АМ после размораживания нежная, полупрозрачная ткань прилипает сама к себе, при перемещении сворачивается и

комкается. Необходимо для удобства в процессе культивирования фиксировать к адгезивному пластику небольшого размера или обрабатывать дополнительно поверхность культуральной посуды и через время заливать определённым объёмом питательной среды.

По мнению исследователей, для достаточно высоких показателей сохранности и выживаемости СК после криоконсервирования необходимо снижение концентрации ДМСО и сыворотки как компонентов криозащитной среды. Для поддержания адгезии, миграции и пролиферации культивированных клеток необходим матрикс, обладающий высокой механической прочностью и биосовместимостью.

Наш выбор сделан в пользу сертифицированного платекса амниотического (ПА), субстрата производства ИпКиК (г.Харьков).

При анализе доступной литературы было выдвинуто предположение о патогенетическом обосновании возможности культивирования послойно нескольких клеточных культур роговицы глаза человека на поверхности АМ, причём интересовал вопрос – на какой из сторон эффективнее адгезия, миграция и пролиферация клеток роговицы. Была сформулирована цель исследования – патогенетическое обоснование создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека.

Для решения поставленной цели были определены задачи:

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.

Исследование проведено в пять этапов, соответственно поставленным задачам. На первом этапе разработана методика выделения лимбальных эпителиальных клеток роговицы и клеток плоского эпителия роговицы глаза человека. Для этого выкраивали лимбальный трансплантат со всей окружности лимба цельного энуклеированного глаза, при этом достигалась равномерная толщина трансплантата, не более $\frac{1}{2}$ толщины склеры. 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. Затем, на ту же глубину, перпендикулярно выполненному разрезу в сторону роговицы, производили 4 надреза на 3, 6, 9 и 12 часов, затем скальпелем отсепаировывали 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.

Для выделения клеток миграционным способом, культуральные флаконы 25см^2 обрабатывали коллагеном, по 8-10 мл раствора наливали на дно флакона, спустя 20 минут инкубации при комнатной температуре раствор удаляли, осторожно промывали дважды питательной средой. Обработку проводили непосредственно перед внесением клеток. Корнеосклеральное кольцо измельчали до размера 2×2 мм и аккуратно помещали на обработанное

коллагеном дно культурального флакона. На 20 минут флакон помещали в термостат при $t=37^{\circ}\text{C}$ в перевернутом положении. Коллаген I типа был получен методом, предложенным S.Strom и соавт. [121] из сухожилий, связанных с позвонками хвоста крысы. Лимбальные трансплантаты, полученные от энуклеированного глаза позволяют сохранить естественное микроокружение лимбальных эпителиальных прогениторных клеток.

Дальнейшее культивирование осуществляли в питательной среде DMEM/F12 1:1 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM, «Sigma», США), с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки («БиолоТ», Россия), 5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферрина, 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 CO_2 инкубаторе при температуре 37°C , с 5%-ным содержанием CO_2 и 95% влажности. В процессе культивирования наблюдали за сменой активности пролиферации клеток, 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.

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.

При визуализации клеточных линий ЛСК и КПЭ наблюдали клеточный рост со стороны обеих культур. При микроскопии ЛСК за 12 дней культивирования наблюдали максимальную способность к пролиферации.

Мигрировавшие клетки из экспланта хорошо распластывались и формировали пласт, имеющий вид голоклона, в котором можно выделить плотно упакованные, компактизованные клетки, исходящие от экспланта и хорошо распластанные к периферии. После пассирования лимбальные клетки из округлых превращались в более удлиненные, формировали агрегаты. При этом между агрегатами возникали контакты, образованные длинными ламеллоподиями. Длинные отростки направлены в сторону движения колонны, а короткие – в противоположную.

К 7-14 суткам культивирования достаточно крупные колонии, содержащие несколько тысяч клеток, начинали активно мигрировать. При появлении пролиферации осуществляли подсчет пролиферирующих клеток. Клетки подсчитывали в поле зрения микроскопа при 40– и 100–кратном увеличении. С целью определения митотического индекса клетки высевали на чашку Петри (35мм), на которой была нанесена сетка для подсчёта (Costar–Corning, США).

Клетки ЛСК и КПЭ, окрашенные РКН26 и РКН76, визуализировали 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.

Время цитогенерации проводили через сутки на 4 образцах после высевания клеток на чашки Петри, в течение 3 суток. Тест на жизнеспособность проводили после ферментативного снятия клеток из культуральной флякона. Клетки суспендировали в физиологическом растворе, помещали в полипропиленовую пробирку 2 мл («Cellstar tubes», Германия) для окраски 4% раствором трипанового синего с 5 мин экспозицией.

Для сравнения пролиферативной активности культур ЛСК и КПЭ проводили анализ клеточной пролиферации 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 (methylthiazoletetrazolium, 3- [4, 5-

диметилтиазол -2-ил]-2, 5- дифенилтетразолия бромид) в нерастворимые в воде темно-синие кристаллы формазана. Такое превращение возможно только в живых клетках в присутствии митохондриального фермента дегидрогеназы сукцината. Нерастворимый в воде формазан элюируется из клеток с помощью органических сольвентов (изопропанола или другого органического растворителя). Оптическая плотность элюата измеряется спектрофотометрично ($\lambda=570\text{nm}$), определяя поглощение как функцию от концентрации превращённого красителя, количество которого прямопропорционально количеству метаболически активных клеток в культуре.

В эксперименте использовался краситель МТТ («Sigma», США), изопропанол («Merck», Германия). Культивирование клеточных линий ЛСК и КПЭ проводили в 24-луночных планшетах («Costar», Германия) в течение двух недель. В каждую лунку добавляли по 1 мл раствора МТТ в культуральной среде DMEM в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали с клетками в течение двух часов в CO_2 инкубаторе и 95% влажности. Конвертированный таким образом краситель вымывали из клеток изопропанолом. 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.

На втором этапе исследования применили известную нам методику для создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека на поверхности АМ: послойное культивирование ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека. Методика не имеет аналогов и защищена патентом Украины. Суть заключалась в использовании криозамороженной АМ, первичном выделении лимбальных клеток с зоны палисадов Фогта, содержащих в своём составе стволовые, первичном выделении КПЭ роговицы, культивировании до необходимой клеточности. АМ трижды промывали в растворе PBS («Sigma», США), аккуратно расправляли на стерильной фольге и разрезали на небольшие кусочки размером 1 см×1 см. В 8-ми луночные плато (μ -Slide 8 well, IBIDI, GmbH,

размер лунки 1см×1см) помещали по восемь образцов стромальной стороной вверх и восемь – базальной мембраной. 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. Смену сред проводили каждые 24 часа в течение 4 суток. Культивирование осуществляли в стандартных условиях в CO₂ инкубаторе, с влажностью 95% при температуре 37С° (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.

Идентификацию лимбальных клеток и КПЭ роговицы глаза человека проводили на третьем этапе с помощью иммуногистохимических исследований.

Согласно многочисленным публикациям исследований в настоящее время не существует окончательного списка антител, которые могут предположительно указывать на принадлежность к компартменту СК лимба.

Проведенный анализ литературы и наши собственные результаты позволяют выбрать среди множества предложенных маркеров с целью идентификации следующие: p63, CK19, CK 3/12, pan-cytokeratin, keratan sulfate, виментин, α -SMA, СД 34, ALDH3A1, c-kit CD 117, EGFR, TGF β 3, ABCDG2, интегрин β 1, Ki67.

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

Проведены иммуногистохимические исследования клеточных культур ЛСК и КПЭ, культивированных в монокультуре, на культуральном пластике на 4-9 пассажах. А также в составе многослойного культивирования на поверхности стромальной и базальной сторонах АМ на маркеры стволовых клеток и маркеры дифференцировки.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что экспрессия ядерного маркера p63 с 0,85% к концу культивирования снизилась до 0,34 %, но к 5 пассажу наблюдался резкий подъем до 1,17 %.

Некоторые исследователи утверждают, что стволовость в культуре лимбальных клеток сохраняется в течение 1,5 месяцев культивирования *in vitro*. Предположим, что нестабильная экспрессия маркера стволовых клеток всё же указывает на наличие высокого пролиферативного потенциала стволовых клеток.

Цитоплазматическое окрашивание маркера клеток-предшественников CD 117 имеет большое значение в выживаемости ЛСК, пролиферации и дифференцировки: с возрастанием пролиферации увеличивалось с 2,55 % до 10,89 %. К 5 пассажу характерно увеличение экспрессии вдвое до 26,06 %.

По мнению многих исследователей ABCDG2 может быть одним из важных маркеров для идентификации базальных лимбальных клеток роговицы. На втором пассаже наблюдалось высокая экспрессия ABCDG2 87,69% и к пятому возрастала до 93,69%. Небольшой спад наблюдали на четвертом пассаже. Вероятно, базальные эпителиальные лимбальные клетки обладают метаболической активностью и способностью противостоять разрушающему действию кислородных радикалов при повышении редокс-статуса.

Наблюдали высокую пролиферативную активность культивированных ЛСК, экспрессия Ki67 увеличивалась с 32,22% на четвёртом пассаже и составила 74,05% на девятом пассаже.

Установлено по результатам иммуногистохимических исследований, что с увеличением пассажа наблюдается плавное снижение экспрессии специфического белка ALDH3A1 в процессе культивирования ЛСК: с 91% на втором пассаже до 67,6 % на шестом соответственно. Можно предположить, что экспрессировали роговичный кристаллин ALDH3A1 базальные лимбальные эпителиальные клетки роговицы. В недавних исследованиях показано, что цитоплазматический белок, обнаруженный в ядре, указывает на возможную роль в регуляции клеточной пролиферации. Это открытие доказывает, что ферменты

ALDH не только защищают глаз от окислительного стресса, но и когда расположены в ядре, они могут выполнять регулирующую функцию клеточного цикла, указывая на возможную связь между их расположением в ядре и их функцией в клеточной пролиферации [70].

Экспрессии EGFR на 4 пассаже составляла 96,19%, а на 8 пассаже снизилась до 69, 23%. Высокая экспрессия рецептора эпидермального фактора роста, вероятно, указывает на его наличие на поверхности клеток, что стимулирует клеточный рост и клеточную дифференцировку эпителиального покрова.

Экспрессия TGFb3 на четвертом пассаже составила 50,97% окрашенных клеток, но к девятому пассажу составила 29,77%. Факторы роста семейства TGF являются одними из ключевых медиаторов фиброза. TGF стимулирует эпителиально – мезенхимальный переход клеток эпителия роговицы.

Экспрессия Integrin $\beta 1$ была волнообразной: на пятом пассаже составила 46,66%, а 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, в промежуточных пассажах наблюдалось заметное уменьшение. В роговицы высокое содержание keratan sulfate, по-видимому, связано с поддержанием уровня гидратации ткани, критического для прозрачности роговицы.

Полученные результаты указывают на то, что 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: для третьего пассажа составила 42,3 %, на пятом – 40,78%.

Пролиферирующие клетки находятся в базальном слое лимба, что подтверждено высокой экспрессией ALDH3A1, CD 117, CK 3/12 и низкой, по сравнению с предыдущими маркерами, p63.

Для КПЭ форма клеток была преимущественно три- и полигональная, для наиболее уплотнённых клеток было характерно наличие небольших отростков. Клетки данного типа обладали высокой пролиферативной активностью и формировали плотные зоны роста. Клетки характеризовались гомогенной цитоплазмой, хорошо заметным ядром и ядрышком. При дальнейшем культивировании первичной культуры клетки распластывались по поверхности пластика, увеличивались в размерах. По мере увеличения количества клеток в культуре их отростки плотнее примыкали друг к другу, так что границы отдельных клеток не всегда были чётко 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.

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 метода определения времени удвоения популяции при культивировании клеток в течение нескольких пассажей в лунках 6-ти луночного планшета на 1-е и 5-е сутки культивирования при одинаковой плотности посева ($10^4/\text{см}^2$), прямого подсчёта количества клеток и иммуногистохимии. Доказано, что виментин обеспечивает целостность клеток и их устойчивость к механическим воздействиям, участвует во взаимодействиях разных систем цитоскелета, обеспечивает прочность клетки и устойчивость к механическому стрессу, управляет транспортом липопротеинов малой плотности, формирует

клетку вокруг агрегируемого белка. При уменьшении виментина, клетки становятся чувствительны к механическому повреждению. Пролиферативная активность исследованных культур, возможно, связана со степенью детерминированности клеток, входящих в состав исследованных культур, а также функциональными особенностями источников *in vivo*. ЛСК обладают высоким пролиферативным потенциалом и способностью к самообновлению.

Эпителий лимбальной зоны и передний эпителий роговицы характеризуется как единая тканевая система, содержащая камбиальные элементы, дифференцирующиеся и дифференцированные эпителиоциты ткани, выполняющие покровную и защитную функции.

Криоконсервирование биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека проводили на четвертом этапе.

Образцы АМ с культивированными монослоями ЛСК и КПЭ помещали в криопакет размером 2×3 см (Nunc, Германия) с культуральной средой, 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. Образцы хранили при –196°C в течение 4-6 месяцев. После размораживания и удаления криопротектора проводили иммуногистохимические исследования для изучения процессов, происходящих на поверхности субстрата и между монослоями культивированных ЛСК и КПЭ. Для исследования посредством световой микроскопии часть образцов окрашивали на гематоксилин-эозин и по Романовскому-Гимзе.

Критерии оценки препаратов характеризовали адгезивную и пролиферативную активность ЛСК и КПЭ роговицы, характерно экспрессии маркеров стволовых клеток и маркеров дифференцировки.

В данном исследовании показано:

- использованный в качестве маркера ассоциированных с ЛСК транскрипционный фактор Р63 показал ядерное окрашивание;

- маркер ABCDG2 стромальных клеток и СК лимба показал ядерно-цитоплазматическое окрашивание;
- положительно экспрессия маркеров ALDH3A1, EGFR, integrin β 1, keratin sulfate, TGF β 3 в культивированных базальных лимбальных клетках на поверхности стромальной и базальной сторонах АМ в сравнительном исследовании не выявила существенных различий.

Пятый этап исследования состоял в патогенетическом обосновании возможности криоконсервации биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека. Выбор адекватного субстрата, в данном случае, АМ, позволяющего сохранить свойства ЛСК и КПЭ в условиях послойного культивирования позволил приступить к криобиологическому направлению-изучению и обоснованию криоконсервации ЛСК и КПЭ роговицы глаза человека в составе носителя. Культивированные ЛСК и КПЭ на поверхности АМ в качестве субстрата, обладающего высокой механической прочностью и сохраняющего многослойное культивирование. Криоконсервация ЛСК и КПЭ в составе питательной среды DMEM/F12, содержащей 20% ЭТС и 10% ДМСО, путем медленного замораживания со скоростью 1 градус в минуту до -80°C с последующем погружением в жидкий азот, существенно позволяет сохранить ультраструктуру ткани, а также способность ЛСК и КПЭ сохранять их морфофункциональные свойства.

Полученные в работе результаты открывают новое направление криобиологии-криоконсервирование клеточных культур роговицы глаза человека в составе биоинженерной конструкции (схема 2). 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: стромальную и базальную стороны для

культивирования клеток роговицы глаза человека. Наличие криоконсервированного биоэквивалента в достаточном количестве, является благоприятным фактором для применения в офтальмохирургии при различных патологических состояниях, вызванных синдромом лимбальной клеточной недостаточности.

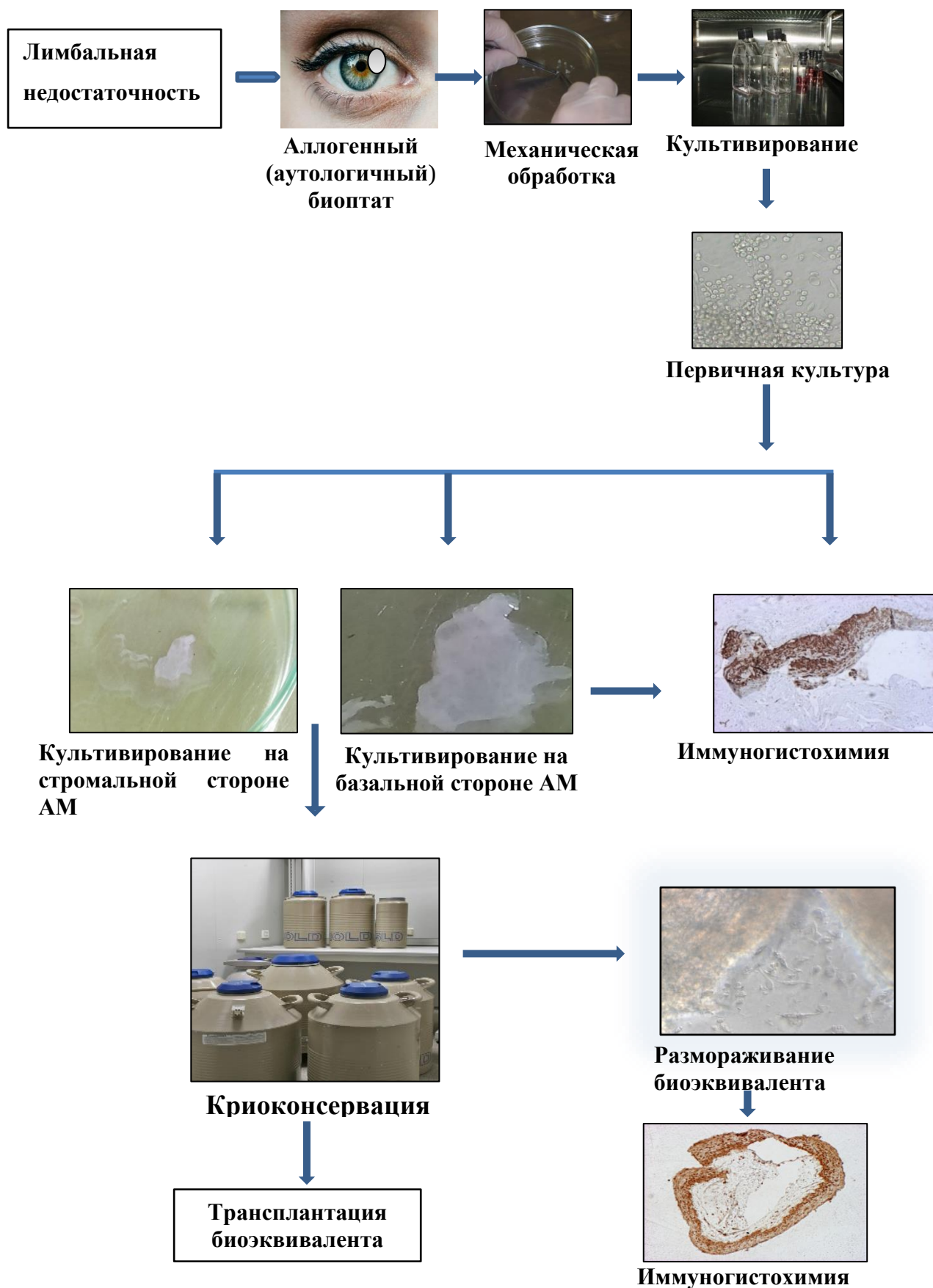


Схема 2. Алгоритм применения биоэквивалента поверхностных слоев роговицы глаза человека с учетом патогенетического обоснования.

ВЫВОДЫ

1. В исследовании предложено концептуальный подход и новое решение актуальной научной проблемы по патогенетическому обоснованию создания биоэквивалента поверхностных слоев роговицы. 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 скорости 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, виментина, keratana sulfate, TGFb3, EGFR, Ki67, integrin β 1 и отсутствие следующих маркеров: CD 34, α -SMA, что позволяет говорить об адекватном режиме первичного выделения и культивирования. Для КПЭ характерна экспрессия маркеров эпителиальных клеток.
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 выделением миграционным способом, методом экспланта.
2. Для идентификации лимбальных клеток, содержащих в составе стволовые, могут рекомендоваться следующие антитела: p63, cytokeratin 19, cytokeratin 3/12, pan– cytokeratin, ki67, keratin sulfate, vimentin, α -SMA, CD 34, ALDH3A1, c-kit CD 117, EGFR, TGF β 3, ABCDG2, интегрин β 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 СОКРАЩЕНИЙ

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)

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 β – интерлейкин 1 β

KGF – фактор роста кератиноцитов (Keratinocyte growth factor)

PBS - фосфатно- буферный раствор (phosphate buffer solution)

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

TGF α – трансформирующий фактор роста α (Transforming growth factor alpha)

TGF β 1 – трансформирующий фактор роста β 1 (Transforming growth factor β 1)

TGF β 2 – трансформирующий фактор роста β 2 (Transforming growth factor β 2)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астахов, С.Ю. О новом подходе к хирургическому лечению эндотелиальной дистрофии роговицы / С.Ю. Астахов, И.А. Рикс, С.С. Папанян [и др.] // Офтальмологические ведомости. – 2018. – Т. 11. - № 1. – С.78-84. doi:10.17816/OV11178 –84
2. Астахов, Ю.С. Лекарственный справочник врача-офтальмолога / Ю.С. Астахов, Г.В. Ангелопуло, М.В. Волкова: под ред. Ю.С. Астахова: «Санкт-Петербург», издательство «Сага», 2002. – 176 с.
3. Базиков, И.А. Оценка эффективности применения офтальмологического ниосомального геля «регенерин» в лечении химического ожога / И.А. Базиков, В.С. Боташева, Н.И. Калинкина [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2017. – Т.13. – №2. – С.216-220.
4. Борзенко, С.А. Методические основы трансплантации аутологичного культивированного эпителия полости рта / С.А. Борзенко, Б.Э. Малюгин, М.Ю. Герасимов [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – №23. – С. 171–177. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-1-171-177>.
5. Ботабекова, Т.К. Хирургическая и консервативная тактика в лечении тяжелых форм язв роговицы / Т.К. Ботабекова, М.С. Сулейменов, Б.И. Исергепова [и др.] // Точка зрения. ВОСТОК – ЗАПАД. – 2015. – № 2. – С.23-25.
6. Бочкарева, А.Н. Анализ клинической эффективности методики профилактики рецидивирующего течения птеригиума / А.Н. Бочкарева, В.В. Егоров, Г.П. Смолякова [и др.] // Русский медицинский журнал. – 2018. -№1. – С.20-25. doi:10.21689/2311-7729-2018-18-1-20-25.
7. Бочкарева, А.Н. Инновационный подход к барьерной амниопластике в хирургическом лечении первичного прогрессирующего птеригиума / А.Н. Бочкарева, В.В. Егоров, Г.П. Смолякова // Офтальмологические ведомости. – 2019. – Т.12. – №4. – С.13-21. doi: 10.17816/OV17649

8. Бржеская И.В. Асептические язвы роговицы при некоторых тяжелых заболеваниях глаз и способы их лечения. дис. ... к. мед. н.: 14.01.07 / Бржеская Ирина Вячеславовна. – Санкт-Петербург., 2018. – 151 с.
9. Вериго, Е.Н. Использование индивидуальных форм протезов в целях повышения эффективности функционально- косметических результатов глазопротезирования / Е.Н. Вериго, И.А. Филатова, Е.П. Садовская [и др.] // Вестник офтальмологии – 2015. – №6. – С.43-50.
<https://www.mediasphera.ru/issues/vestnik-oftalmologii/2015/6/530042-465X2015067>
10. Галеева Г.З., Расческов А.Ю. Современные подходы к местной антибактериальной терапии в офтальмопедиатрии / Г.З. Галеева, А.Ю. Расческов // Практическая медицина. – 2017. – №3.
11. Гланц, С. Медико- биологическая статистика / С. Гланц – М.: Практика, 1998. – 459 с.
12. Гринь, В.К. Спосіб отримання трансплантата лімбальних клітин на амніотичній оболонці / В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, Г.С. Кавеліна [та інш.] // Патент на корисну модель № 65506 А 61 F 9/00. Донецький національний медичний університет ім. М. Горького. Опубліковано 12.12.2011. – Бюл. №23.
13. Гундорова, Р.А. Систематизация клиники, диагностики и лечения поражений роговицы при травматической болезни органа зрения / Р. А. Гундорова // Новые технологии в лечении заболеваний роговицы. Науч. Практ. Конф. – М. – 2004. – С.94-99.
14. Данилов, Р. Общая и медицинская эмбриология: учебное пособие для ВУЗов / Р. Данилов, Т. Боровая. Litres, – 2003. – 352 с.
15. Дубовиков, А.С. Лимбальная недостаточность: этиология, патогенез, принципы и перспективы хирургического лечения / А.С. Дубовиков, И.О. Гаврилюк, А.Н. Куликов [и др.] // Рос. Офтальмологический журнал. – 2019. № 12. – С.103-111.

16. Енгибарян, Н.А. Проблемы хирургического лечения опухолей орбитальной локализации / Н.А. Енгибарян, Ю.В. Ульянова // *Medical Sciences, фундаментальные исследования*. – 2014. – № 7. – С. 56-59.
17. Еричев, В.П. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней / В. П. Еричев, С.Ю. Петров, А.М. Суббот [и др.] // *Нац. журнал глаукома*. – 2017. – Т.16. – №1. – С. 85-99.
18. Жумагаликызы, С. Применение моноклеарной фракции аутологичных клеток костного мозга и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при лечении постинфарктного кардиосклероза в эксперименте / С. Жумагаликызы, М.З. Кауламбаева, Н.Н. Ахметсадыков, [и др.] // *Проблемы криобиологии и криомедицины*. – 2013. – Т. 23. – № 3. – С.271-274.
19. Заболотный А.Г. Медико-организационные основы ресурсного обеспечения региональной офтальмологической службы в Российской Федерации: нормативно-правовые аспекты (обзор литературы) / А.Г. Заболотный // *Сибирский научный медицинский журнал*. – 2019. –Том 39. – №3. – С.130-137.
20. Завалеева, С. Цитология и гистология: учебное пособие / С. Завалеева. ЛитРес. – 2022. – С.216.
21. Зайнутдинова, Г.Х. Современные подходы к лечению и профилактики рецидивов офтальмогерпеса. Обзор / Г.Х. Зайнутдинова // *Офтальмология*. – 2019. №6. – С. 12-20. <https://doi.org/10.18008/186-5095-2019-1S-2-20> (дата обращения 15.01.19).
22. Золоторевский, А.В. Применение «материала для восстановления роговицы» при выполнении сквозной кератопластики / А.В. Золоторевский, Д.Д. Дементьев, Е.М. Кильдюшов [и др.]. - Учебное пособие. – Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2016. –Т.16. –№2. – С.46-50.
23. Ивачев, Е.А. Хирургическое лечение перфорации роговицы аутоотканями: клинический случай / Е.А. Ивачев // *Российский офтальмологический*

- журнал. – 2018. – №11. – С. 80-84. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2018-11-1-80-84>
24. Иволгина, И.В. Хирургическое лечение птоза верхнего века. Выбор метода операции / И.В. Иволгина // Вестник Тамбовского университета. – 2016. – Т.21. – Вып.6. <https://cyberleninka.ru/article/n/hirurgicheskoe-lechenie-ptozavverhnego-veka-vybor-metoda-operatsii/viewer>
25. Кадыров, Р.З. Трансплантационные материалы для послойной кератопластики. / Р.З. Кадыров, О.Р. Шангина // Практическая медицина. Современные вопросы офтальмологии. – 2018. – Том 16. №04(18).
26. Камская, В.Е. Хитозан: структура, свойства и использование / В.Е. Камская // Научное обозрение. Биологические науки. – 2016. – №6. – С. 36-42. <https://science-biology.ru/ru/article/view?id=1020>
27. Каспарова, Евг.А. Лечебная кератопластика при гнойных язвах роговицы, развившихся на фоне нейротрофического кератита и паралитического лагофтальма / Евг. А. Каспарова, О.И. Собкова, Е.А. Каспарова [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2017. – №133. – С.32-37. <https://doi.org/10.17116/oftalma2017133532-37>.
28. Киселев, А.В. Лимбальная аллотрансплантация в комбинации с аутоконъюнктивопластикой – метод выбора при лечении рецидивирующего птеригиума / А.В. Киселев, А.Г. Заболотный, Н.Ю. Калинина // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – №4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30083>.
29. Кузьмичев, К.Н. Клинико-экспериментальное обоснование технологии задней послойной кератопластики с использованием ультратонкого трансплантата, заготовленного с эндотелиальной поверхности роговицы с помощью низкочастотного фемтосекундного лазера: дис. ... канд. мед. наук: 3.1.5 / Кузьмичев Константин Николаевич. – М., 2022. – 148 с. <https://mntk.ru/files/upload/avtoreferat-Kyzmichev.pdf>
30. Куликов, А.Н. Современные подходы к проблеме выбора носителя для культивирования стволовых клеток роговицы в лечении лимбальной

- недостаточности / А.Н. Куликов, С.В. Чурашов, В.Ф. Черныш [и др.] // Офтальмологические ведомости. – 2018. – Том 11. – №2. – С.48-56.
- 31.Лях, Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом «MedStart» / Ю. Е. Лях, В. Г. Гурьянов, В. Н. Хоменко [и др.]. – Донецк. – 2006. – 214 с.
- 32.Мальцев, Д.С. Влияние экстракта амниотической мембраны на эпителизацию и неоваскуляризацию в моделях повреждения роговицы / Д.С. Мальцев, А.С. Рудько, А.Н. Куликов [и др.] // Тихоокеанский Медицинский Журнал. – 2018. -№2. – С.46-49. Doi:10.17238/Pmj1609-1175.2018.2.46-49.
- 33.Малюгин, Б.Э. Клеточная хирургия при дисфункции стволовых клеток лимба / Б.Э. Малюгин, М.Ю. Герасимов, С.А. Борзенко [и др.] // Офтальмохирургия. – 2019. – №1. DOI: <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2019-1-77-86>.
- 34.Малюгин, Б.Э. Разработка биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе пленочного матрикса из спидроина и культивированных клеток лимбальной зоны / Б.Э. Малюгин, С.А. Борзенко, И.Н. Сабурова [и др.] // Офтальмохирургия. – 2013. – №4. – С.89-97.
- 35.Мойсунович, М.М. Композитные матриксы на основе фиброина шёлка, желатина и гидроксиапатита для регенеративной медицины и культивирования клеток в трёхмерной культуре / М.М. Мойсунович, А.Ю. Архипова, А.А. Орлова [и др.] // Acta naturae. – 2014. – Том 6. №1. – С.103-109.
- 36.Назарян М.Г. Комплексное исследование инвалидности вследствие болезней глаза и его придаточного аппарата и совершенствование системы мер по медико-социальной реабилитации. дис. ... д. мед. наук: 14.02.06 / Назарян Марина Грачиковна. – М., 2019. – 259 с.
- 37.Нураева, А.Б. Трансплантационные технологии в лечении буллезной кератопатии / А.Б. Нураева // Медицинский вестник Башкортостана. –

2021. – Т.16. – №4. – С.11-14.
<https://cyberleninka.ru/article/n/transplantatsionnye-tehnologii-v-lechenii-bulleznoy-keratopatii/viewer>.
- 38.Осипян Г.А. Интрастромальная аллотрансплантация с фемтолазерным сопровождением в лечении кератэктазий различного генеза: дис. ... д. мед. наук: 14.01.07 / Осипян Григорий Альбертович. – М., 2021. – 330 с.
- 39.Павлова, В.Н. История открытия стволовых клеток крови / В. Н. Павлова // Научно- практический электронный журнал Аллея Науки. – 2020. – №12(51). https://alley-science.ru/domains_data/files/3December2020/ISTORIYa%20OTKRYTIYa%20STVOLOVYHN%20KLETOK%20KROVI.pdf
- 40.Пасечникова, Н.В. Особенности процессов адгезии и пролиферации монослоя фетальных фибробластов на гидрофильных мягких контактных линзах, содержащих коллаген / Н.В. Пасечникова, Г.И. Дрожжина, О.Н. Иванова [др.] // IX съезд офтальмологов России. Москва. – 2010. – С.333.
- 41.Петренко, Ю.А. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки из разных источников: криоконсервирование, свойства при монослойном и трёхмерном культивировании: дис. ... доктора мед. наук: 03.00.19 / Петренко Юрий Александрович. – Харьков, 2013. – С.313.
- 42.Попандопуло, А.Г. Спосіб отримання культивованих лімбальних стовбурових клітин та клітин плоского епітелію рогівки на амніотичній оболонці / А.Г. Попандопуло, А.С. Кавеліна [та інш.]: Патент на корисну модель №87174 А61F 9/00 Державна Установа «Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В.К. Гусака НАМН України». Опубліковано 27.01.2014 Бюл. №2.
- 43.Рожко, Ю.И. Дистрофии роговицы. Практическое пособие для врачей / Ю. И. Рожко, О.А. Щемелева, А.А. Рожко. – Гомель: «РНПЦ и ЭЧ», –2020. – 88 с.

- 44.Рожко, Ю.И. Конъюнктивиты: практическое пособие для врачей / Ю.И. Рожко, Е.А. Тарасюк, А.А. Рожко. – Гомель: ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», 2016. – 124 с.
- 45.Свидко, Е. Морфологическое подтверждение экспериментальной модели лимбальной клеточной недостаточности / Е. Свидко, Ю. Демин // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. –2013. – №2 (216). – С. 41-48. http://ecoproblemflug.ucoz.ua/2_116/41-48.pdf.
- 46.Середа, Е. Влияние жизнеспособной криоконсервированной амниотической мембраны человека при ее фиксации к роговице шовным материалом на особенности течения моделированного бактериального кератита / Е. В. Середа, Г. И. Дрожжина, Т. Б. Гайдамака [и др.] // Офтальмол. журн. – 2015. — № 5. — С. 35-41.
- 47.Скачков, Д. Отдаленные результаты интрастромальной имплантации амниотической мембраны в лечении пациентов с индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофией роговицы / Д.П. Скачков, А.Л. Штилерман //Офтальмохирургия. – 2014. – С.38-41.
- 48.Скачков, Д.П. Комбинация энергетических методов воздействия в лечении индуцированной дистрофии роговицы / Д.П. Скачков, Д.Я. Дровняк, А.Л. Штилерман // Pacific Medical Journal. – 2018. – N.2. – P.78-82. Doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.2.82-84
- 49.Скачков, Д.П. Морфологические изменения роговицы после интрастромальной имплантации амниона при эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы в эксперименте / Д.П. Скачков, А.А. Григоренко, А.Л. Штилерман // Якут. мед. журн. – 2012. – №2. – С.41-43.
- 50.Суббот, А. Обзор подходов к клеточной терапии в офтальмологии / А. Суббот, Е. Каспарова, Е. Каспарова // Вестник офтальмологии. – 2015. –№ 131(5). – С. 74-81.
- 51.Терещенко, А.В. Влияние препарата пептидов на постожоговые воспалительные процессы поврежденных тканей роговицы в эксперименте

- / А.В. Терещенко, И.Г. Трифаненкова, А.М. Кодунов [и др.] // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2019. – Vol.4. – №4. doi:10.29413/ABS. 2019 -4.4.4.
- 52.Тлеубаев, К.А. Культивированные клетки лимба в лечении ожогов роговицы: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Тлеубаев Касымхан Аблайханович. – Алматы. –2009. – 18с.
- 53.Труфанов, С.В. Дегенерации роговицы /С.В. Труфанов, Е.П. Саловарова, Л.Ю. Текеева // *Вестник офтальмологии*. – 2018. –№138. – С. 282-288. doi.org/10.17116/oftalma2018134051282.
- 54.Труфанов, С.В. Дисфункция эндотелиального слоя роговицы: этиопатогенез и современные подходы к лечению / Труфанов С.В., Саловарова Е.П. // *Клиническая офтальмология*. – 2019;19(2). – С.116-119. DOI: 10.32364/2311-7729-2019-19-2-116-119.
- 55.Труфанов, С.В. Рецидивирующая эрозия роговицы / С.В. Труфанов, А.С. Сейфеддин, В.А. Тургель // *Офтальмологические ведомости*. – 2021. – Т. 14. – №4. – С. 55-64. doi:10.17816/OV90921
- 56.Федорова, Е.А. Применение лиофилизированной амниотической оболочки в лечении воспалительных заболеваний роговицы: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Федорова Елена Анатольевна. – М., 2004. – 24с.
- 57.Ченцова, Е.В. Современные аспекты лечения язвенных поражений роговицы / Е.В. Ченцова, Е.Н. Вериги, А.И. Ходамова [и др.] // *Евразийский союз ученых Медицинские науки*. – 2016. – №2. – С. 99-105.
- 58.Ченцова, Е.В. Тактика лечения сочетанной ожоговой травмы глаза у больных, госпитализированных в ожоговые отделения / Е.В. Ченцова, П.В. Макаров, Е.Н. Вериги [и др.] // *Российский офтальмологический журнал*. – 2018; 11(3). – С. 37-42. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2018-11-3-37-42>.
- 59.Чернакова, Г.М. Рекомендации по ведению пациентов с герпетическим кератитом/кератоувеитом затяжного течения: от проблем к решению / Г. М. Чернакова, Д.Ю. Майчук, Е.А. Клещева [и др.] // *Офтальмология*. – 2019. №16. – С. 537-545.

- 60.Черныш, В.Ф. Ожоги глаз. Состояние проблемы и новые подходы / В.Ф. Черныш, Э.В. Бойко. - Издательство: ГЭОТАР-Медиа, 2017. –184 с.
- 61.Abdul-Al, M. Stem cell niche microenvironment: review / M. Abdul-Al, GK. Kyeremeh, M. Saeinasab [et al.] // Bioengineering (Basel). – 2021. – Vol.8. – P. 108. doi:10.3390/bioengineering8080108.
- 62.Aghayan, H. Bacterial contamination of amniotic membrane in a tissue bank from Iran / H. Aghayan, P. Goodarzi, A. Baradaran- Rafii, [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2013. – Vol.14. – P.401-406.
- 63.Al- Aqaba, MA. Nerve terminals at the human corneoscleral limbus / MA. Al-Aqaba, FS. Anis, I. Mohammed [et al.] // Br J Ophthalmol. – 2018. – Vol. 102. – P. 556-561. doi:10.1136/bjophthalmol-2017-311146.
- 64.Altshuler, A. Discrete limbal epithelial stem cell population mediate corneal homeostasis and wound healing / A. Altshuler, A. Amitai-Lange, N. Tarazi N. [et al.] // Cell Stem Cell. – 2021. – Vol.28. – P.1248-1261. doi: 10.1016/j.stem.2021.04003.
- 65.Ariza-Gracia, MÁ. Corneal biomechanics after intrastromal ring surgery: optomechanical in silico assessment / MÁ. Ariza-Gracia, J. Flecha-Lescún, P. Büchler [et al.] // Transl Vis Sci Technol. – 2020. – Vol. 9. – P.6. doi: 10.1167/tvst.9.11.26.
- 66.Atallah, M. Limbal stem cell transplantation: current perspectives / M. Atallah, S. Palioura, V.Perez [et al.] // Clin Ophthalmol. – 2016. – Vol. 10. – P. 593–602.
- 67.Atkinson, K. The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells – Set / K. Atkinson; John Wiley & Sons. – 2016. – C. 1048.
- 68.Avadhanam, V. Keratoprotheses for corneal blindness: a review of contemporary devices / V. Avadhanam, H. Smith, C. Liu // Clin Ophthalmol. – 2015. –V.9. – P.697–720.
- 69.Banayan, N. In vivo confocal microscopy and optical coherence tomography as innovative tools for the diagnosis of limbal stem cell deficiency / N. Banayan, C. Georgeon, K. Grieve [et al.] // J Fr Ophthalmol. – 2018. – Vol.41. – P.395-406. doi:10.1016/j.jfo.2018.09.003.

70. Bardag- Gorse, F. Aldehyde Dehydrogenase Expression in Corneal Epithelial Cells with Limbal Stem Cell Deficiency / F. Bardag-Gorse, A. Diaz, R. Niihara [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol.23. – P.4032.
71. Bertoncello, I. *Stem Cells in the Lung: Development, Repair and Regeneration* / I. Bertoncello // Springer. – 2015. – P. 366.
72. Bhattacharya, N. *Regenerative Medicine: Using Non-Fetal Sources of Stem Cells* / N. Bhattacharya, P. Stubblefield // Springer. – 2014. – P.285.
73. Cabral, J.V. Ex vivo cultivated oral mucosal epithelial cell transplantation for limbal stem cell deficiency: a review / J.V. Cabral, C.J. Jackson, T.P. Utheim [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2020. Vol.11. – P. 301. doi:10.1186/s13287-020-01783-8.
74. Calegari, F. *Stem Cells: From Basic Research to Therapy, Volume Two: Tissue Homeostasis and Regeneration during Adulthood, Applications, Legislation and Ethics* / F. Calegari, C. Waskow // CRC Press. – 2016 г. – P. 474.
75. Canturk, Z. Cytotoxic and apoptotic effects of boron compounds on leukemia cell line / Z. Canturk, S. Tunalı, Z. Korkmaz [et al.] // *Cytotechnology.* – 2016. – Vol.68. – P.87–93.
76. Carnt, N.A. The relationship between environmental sources and the susceptibility of *Acanthamoeba* keratitis in the United Kingdom / N.A. Carnt, D. Subedi, S. Connor [et al.] // *PLoS One.* – 2020. – Vol.15. doi:10.1371/journal.pone.0229681.
77. Carter, K. Characterizing the impact of 2D and 3D culture conditions on the therapeutic effects of human mesenchymal stem cell secretoma on corneal wound healing in vitro and ex vivo / K. Carter, HJ. Lee, KS. Na [et al.] // *Acta Biomater.* – 2019. – Vol.99. – P.247-257. doi:10.1016/j.actbio.2019.09.022.
78. Casaroli- Marano, R. *Cell-Based Therapy for Retinal Degenerative Disease* / R.P. Casaroli- Marano, M.A. Zarbin // Karger Medical and Scientific Publishers. – 2014. – P. 218.

- 79.Cason, J. Amniotic Membrane Transplant / J. Cason, A. Kozak, B. Feldman [et al.] // EyeWiki. American Academy of Ophtalmology. – 2021. https://eyewiki.org/Amniotic_Membrane_Transplant
- 80.Chakravarti, S. Genetic disorders of the extracellular matrix: from cell and gene therapy to future applications in regenerative medicine / S. Chakravarti, E. Enzo, M. Rocha Monteiro de Barros [et al.] // Annu Rev Genomics Hum Genet. – 2022. – Vol.23. – P.193-222. doi:10.1146/annurev-genom-083117-021702.
- 81.Chen, J. Substance P and patterned silk biomaterial stimulate periodontal ligament stem cells to form corneal stroma in a bioengineered three-dimensional model /J. Chen, W. Zhang, P. Kelk [et al.] //Stem Cell Res Ther. – 2017. – Vol.8. – P. 260. doi:10.1186/s13287-017-0715-y.
- 82.Cheung, A. Cincinnati protocol for preoperative screening and donor selection for ocular surface stem cell transplantation / A. Cheung, E. Sarnicola, K. Kurji [et al.] // Cornea. – 2018. – Vol.37. – P. 1192-1197. doi:10.1097/ICO.0000000000001662.
- 83.Cheung, A. Long-term outcomes of living-related conjunctival limbal allograft compared with keratolimbal allograft in patients with limbal stem cell deficiency / A. Cheung, M. Eslani, KH. Kurji [et.al.] // Cornea. – 2020. – Vol.39. – P.980-985. doi:10.1097/ICO.0000000000002329.
- 84.Cheung, A. Surgical management of severe ocular surface injury due to roman candle explosion accidents / A. Cheung, B. Genereux, B. Dautremont [et al.] // Ocul Surf. – 2018. – Vol.16. –P. 94-300. doi:10.1016/j.jtos.2018.03.005. Epub 2018 Mar 20.
- 85.Chirila T., Barnard Z. et al. Bombyx mori silk fibroin membranes as potential substrata for epithelial constructs used in the management of ocular surface disorders / T. Chirila, Z. Barnard, D.G. Harkin [et al.] // Tissue Eng. Part A. – 2008. – Vol. 14. – P.1203-1211. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0224.
- 86.Choi, J.Y. Successful Treatment of Bilateral Conjunctival – Corneal Intraepithelial Neoplasia: Case Report and Review of the Literature / J. Y. Choi, D.H. Lee, J.H. Kim. // J Korean Ophthalmol Soc. – 2013. Vol.54. – P. 357–364.

- 87.Dallal, MMS Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects and ulceration due to Pseudomonas keratitis in a rabbit model / Dallal MMS, Nikkhahi F., Imeni S.M., [et al.] Ophthalmic Vis Res. – 2021. – Vol.16. – P.552-557. doi:10.18502/jovr.v16i4.9744. eCollection 2021 Oct-Dec.PMID: 34840677
- 88.Dalous, J. Transplantation of umbilical cord–derived mesenchymal stem cells as a novel strategy to protect the central nervous system: technical aspects, preclinical studies, and clinical perspectives / J. Dalous, J. Larghero, O. Baud // Pediatric Research. – 2012. – № 71. – P.482–490.
- 89.Danquah, M. Emerging Trends in Cell and Gene Therapy / M. Danquah, R. Mahato // Springer Science & Business Media. – 2013. – P. 705.
- 90.Davies, J. Mechanisms of Morphogenesis / J. Davies // Academic Press. –2013. – P. 414.
- 91.Daya, S.M. Cornea Society nomenclature for ocular surface rehabilitative procedures / S.M. Daya, C.C. Chan, E.J. Holland // Cornea. – 2011. – Vol.30. – P.1115-1119. doi:10.1097/ICO.0b013e318207f135.
- 92.De la Mata, A. Chitosan-gelatin biopolymers as carrier substrata for limbal epithelial stem cells / A. De la Mata, T. Nieto-Miguel, M. Lopez-Paniagua [et al.] // J Mater Sci Mater Med. – 2013. – Vol.24. – P. 2819-2829. doi:10.1007/s10856-013-5013-3.
- 93.Deng, S. Global consensus on the management of limbal stem cell deficiency / S. Deng, F. Kruse, J. [et al.] / Cornea. – 2020. – Vol.39. – P. 1291-1302. Doi: 10.1097/ICO.0000000000002358.PMID:32639314.
- 94.Deng, SX. Global consensus on definition, classification, diagnosis, and staging of limbal stem cell deficiency / SX. Deng, V. Borderie, CC. Chan [et al.] // Cornea. – 2019. – Vol. 38. – P. 364-375. doi:10.1097/ICO.0000000000001820.
- 95.Dexter, R. The Role of Apoptosis in Development, Tissue Homeostasis and Malignancy: Death from inside out / R. Dexter, A. Wyllie, M. Raff // Springer Science & Business Media. – 2012. – P. 101.

96. Di Girolamo, N. A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction / N. Di Girolamo, M. Bosch, K. Zamora [et al.] // Transplantation. – 2009. – Vol.87. – P.1571-1578. doi:10.1097/TP.0b013e3181a4bbf2.
97. Dobrowolski, D. An analysis of the progression of conjunctivalisation after transplantation of cultivated corneal epithelium / D. Dobrowolski, B. Orzechowska-Wylegala, B. Wowra [et al.] // J Ophthalmol. – 2021. – Vol.2021. doi:10.1155/2021/8499640.
98. Dos Santos, JF. Mesenchymal stem cells differentiate into keratinocytes and express epidermal kallikreins: towards an in vitro model of human epidermis / JF. Santos Dos, NR. Borcari, M. da Silva Araújo [et. al] // J Cell Biochem. – 2019. – Vol.10. – P.13141-13155. doi:10.1002/jcb.28589.
99. Ekpo, P. Characterization of limbal explant sites: optimization of stem cell outgrowth in in vitro culture / P. Ekpo, N. Inthasin, S. Matamnan [et al.] // PloS One. – 2020. – Vol. 15. doi:10.1371/journal.pone.0233075.
100. El-Hofi, A.H. Evaluation of limbal transplantation in eyes with bilateral severe ocular surface damage secondary to chemical injury / El-Hofi A.H, Helaly H.A. / Clin Ophthalmol. – 2019. – Vol. 13. P. 383-390. doi:10.2147/OPTH.S192316. eCollection 2019.PMID: 30858688
101. Eleiwa, T. Diagnostic performance of 3-dimensional thickness of the endothelium- Descemet complex in fuchs' endothelial cell corneal dystrophy / T. Eleiwa, A. Elsayy, M. Tolba [et al.] // Ophthalmology. – 2020. –Vol.127. – P.874-887. doi:10.1016/j.opthta.2020.01.021.
102. Fagotto, F. The cellular basis of tissue separation /F. Fagotto // Development. – 2014. – V.141. – P. 3303-3318.
103. Feng, Y. Epithelial wound healing on keratin film, amniotic membrane and polystyrene in vitro / Y. Feng, M. Borrelli, T. Meyer- Ter- Vehn [et al.] // Published online. – 2014. – P. 561-570. doi:10.3109/02713683.2013.853804.

104. Feng, Y. Review of alternative carrier material for ocular surface reconstruction / Y. Feng, M. Borelli, S. Reichl [et al.] // *Curr Eye Res.* – 2014. – Vol. 39. – P. 541-52. Doi: 10.3109/02713683.2013.853803.
105. Fernández-Pérez, J. Limbal stromal cells derived from porcine tissue demonstrate mesenchymal characteristics in vitro / J. Fernández-Pérez , M. Binner, C. Werner [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol.7. – P. 6377. doi:10.1038/s41598-017-06898-2.
106. Fielding Hejtmancik, J. *Molecular Biology of Eye Disease* /J. Fielding Hejtmancik, J.M. Nickerson // Academic Press. – 2015. – P. 548.
107. Funderburgh, J.L. Stem cell in the limbal stroma. / J.L. Funderburgh, M. Funderburg, Y. Du // *Ocular Surf.* – 2016. – Vol.14. – P.113-120. doi:10.1016/j.jtos.2015.12.006.
108. Ganger, A. Outcomes of surgical intervention for the treatment of limbal stem cell deficiency / A. Ganger, A. Singh, M. Kalaivani [et al.] // *Indian J Med Res.* – 2021. – Vol.154. – P.51-61. doi:10.4103/ijmr.IJMR_1139_18. PMID:34782530
109. Gericke, A. Expansion and transplantation of limbal stem cells for corneal surface regeneration / A. Gericke, J. Wasielica-Poslednik, M. Zimmermann [et al.] // *Klin Monbl Augenheilkd.* – 2019. – Vol.236. –P.777-783. doi:10. 1055/s-0043-109693.
110. Ghareeb, A.E. Recent advances in stem cell therapy for limbal stem cell deficiency: a narrative review / A.E. Ghareeb, M. Laco, F.C. Figueiredo // *Ophthalmol Ther.* – 2020. –Vol.9. – P.809-831. doi:10. 1007/s40123-00-00305-2. Epub 200 Sep 24. PMID: 32970311
111. Gilarska, A. Lewandowska-Lańcucka J., Horak W., et al. / Collagen/chitosan/hyaluronic acid- based injectable hydrogels for tissue engineering applications- desing, physicochemical and biological characterization / A. Gilarska, J. Lewandowska- Lańcucka, W. Horak [et al.] // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2018. – Vol.170. – P.152-162. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.06.004. PMID: 29902729

112. Goktas, S.E. Surgical amniotic membrane transplantation after conjunctival and limbal tumor excision / S.E. Goktas, Y. Katircioglu, C. Tuba [et al.] // *Arq Bras Oftalmol.* – 2017. – Vol.80. – P.242-246. doi:10.5935/0004-2749.20170059.
113. Gopakumar, V. Clinical outcome of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in ocular surface reconstruction / V. Gopakumar, S. Agarwal, B. Srinivasan [et al.] // *Cornea.* – 2019. Vol.38. – P.1273-1279. doi:10.1097/ICO.0000000000002082.
114. Gore, A. Cultivation and characterization of limbal stem cells on contact lenses with a feeder layer: toward the treatment of limbal stem cell deficiency / A. Gore, V. Horwitz, H. Gutman [et al.] // *Cornea.* – 2014. – Vol. 33. – P.65-71.
115. Grigoryeva, O. Migration properties of adipose-tissue-derived mesenchymal stromal cells cocultured with activated monocytes in vitro / O. Grigoryeva, V. Korovina, V. Gogia [et al.] // *Cell and Tissue Biology.* – 2014. – Vol. 8. – № 5. – P. 359–367.
116. Gross, G. Stem Cell-Dependent Therapies: Mesenchymal Stem Cells in Chronic Inflammatory Disorders / G. Gross, T. Häupl // *Walter de Gruyter.* – 2013. – P.426.
117. Guérin, L P. The human tissue-engineered cornea (hTEC): Recent Progress / L.P. Guérin, G. Le-Bel, P. Desjardins [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol.22. – P.1291. doi:10.3390/ijms22031291.
118. Güell, J.L. *Cornea* / Karger Medical and Scientific Publishers. – 2015. – P. 128.
119. Haagdorens, M. In vitro cultivation of limbal epithelial stem cells on surface- modified crosslinked collagen scaffold / M. Haagdorens, V. Cèpla, E. Melsbach [et al.] // *Stem Cells Int.* – 2019. – Vol. 2019. doi:10.1155/2019/7867613.
120. Haddad A. Maintenance of the corneal epithelium is carried out by germinative cells of its basal stratum and not by presumed stem cells of the

- limbus / A. Haddad, S.J. Faria-e-Sousa // *Braz J Med Biol Res.*, 2014. – Vol.47. – P.6.
121. Hall, B.K. *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology* /B.K. Hall / Academic Press: 2nd edition. – 2015. – P. 920.
 122. Hannah, J. Plastic Compressed collagen constructs for ocular cell culture and transplantation: a new and improved technique of confined fluid loss / J. H. Levis, J. Menzel- Severing, R. Drake //Published online. – 2012. P.41-52. doi: 10.3109/02713683.2012.725799.
 123. Hardy, WR. Transcriptional networks in single perivascular cells sorted from human adipose tissue reveal a hierarchy of mesenchymal stem cells / WR. Hardy, NI. Moldovan, L. Moldovan [et al.] // *Stem Cells*. – 2017. –Vol. 35. – P.1273-1289. doi:10.1002/stem.2599.
 124. Hecht, JL. Classification and reporting guidelines for the pathology diagnosis of placenta accrete spectrum (PAS) disorders: recommendation from an expert panel / JL. Hecht, R. Baergen, LM. Ernst [et al.] // *Mod Pathol*. – 2020. – Vol.33. – P.2382-2396. doi:10.1038/s41379-020-0569-1.
 125. Hematti, P. *Mesenchymal Stromal Cells: Biology and Clinical Applications* / P. Hematti, A. Keating // Springer Science & Business Media. – 2013. – P.695.
 126. Hernáez-Moya, R. Expansion of human limbal epithelial stem/progenitor cells using different human sera: a multivariate statistical analysis / R. Hernáez-Moya, S. González, A. Urkaregi [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol.21. – P. 6132. doi:10.3390/ijms21176132.
 127. Holland, E.J. Management of limbal stem cell deficiency: a historical perspective, past, present, and future / E.J. Holland // *Cornea*. – 2015. Vol.34. – P.9-15. doi:10. 1097/ICO. 0000000000000534
 128. Holland, E.J. *Ocular Surface Disease: Medical and Surgical Management* / E. J. Holland, M.J. Mannis, W.B. Lee. Springer. – 2013. – P. 29-31.
 129. Hosseini, V. A mechanical non-enzymatic method for isolation of mouse embryonic fibroblasts / V. Hosseini, A. Kalantary- Charvadeh, K. Hasegawa [et

- al.] // Mol Biol Rep. – 2020. – Vol.47. – P.8881-8890. doi:10.1007/s11033-020-05940-3.
130. Huang, L.L.H. Medical applications of collagen and hyaluronan in regeneration medicine / L.L.H. Huang, Y.A. Chen, Z.Y. Zhuo [et al.] // Adv Exp Med Biol. – 2018. – Vol.1077. P.285-306. doi: 10.1007/978-981-13-0947-2_15
 131. Hui-Kang Ma D., Hsueh Yi-Jen, Sheng-Kai K., et al. / Long-term survival of cultivated oral mucosal epithelial cells in human cornea: generating cell sheets using an animal product-free culture protocol // Stem cell Res Ther. – 2021. – Vol.12. – P.524. doi:10.1186/s13287-021-02564-7.
 132. Jirsova, K., Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting-a review / K. Jirsova, GLA. Jones // Cell Tissue Bank. – 2017. – Vol.18. – P.193-204. doi:10.1007/s10561-017-9618-5. PMID:28255771
 133. Kadar, T. Limbal stem cell deficiency (LSCD) in rats and mice following whole body exposure to sulfur mustard (SM) vapor / T. Kadar, V. Horwitz, M. Cohen [et al.] // Exp Eye Res. – 2022. – Vol.223. – P.109195. doi:10.1016/j.exer.2022.109195.
 134. Kang, K.B. The effect of micro- and nanoscale surface topographies on silk on human corneal limbal epithelial cell differentiation / K.B. Kang, B.D. Lawrence, X.R. Gao [et al.] // Sci Rep. – 2019. – Vol. 6. – P.1507. doi:10.1038/s4198-018-37804-z.
 135. Karimi-Busheri, F. Biobanking and Cryopreservation of Stem Cells / F. Karimi-Busheri, M. Weinfeld // Springer. – 2016. – P.238.
 136. Kasparova Evg. A., Sobkova O.L., Kasparova E.A. [et.al.] Surgical treatment of purulent corneal ulcers in eyes with neurotrophic keratitis and paralytic lagophthalmos / Evg. A. Kasparova, O.L. Sobkova, E.A. Kasparova [et.al.] // Vestnik Oftalmologii. – 2017. Vol. 133(5). – P. 32-37. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma2017133532-37>
 137. Kasparova, Evg. A. A method of treating purulent corneal ulcer in the eyes with neuroparalytical keratitis and lagophthalmos / Evg. A. Kasparova, A.A.

- Kasparov, O.L. Sobkova [et al.] // Vestnik Oftalmologii. – 2019. Vol.135. – P.220-225. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma2019135052220>
138. Kasparova, Evg. A. Modern treatments for purulent corneal ulcers / Evg.A. Kasparova // Vestnik Oftalmologii. – 2016. Vol. 132(5). P.25-135. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma20161325125-135>
 139. Kasper, C.E. Annual Review of Nursing Research: Exercise in Health and Disease /C.E. Kasper // Springer Publishing Company. – 2013. – P. 300.
 140. Kazumi, M. Long term follow-up of prototheca keratitis: a case report / M. Kazumi, Y. Munemitsu, N. Hideo // Int Med Case Rep J. – 2020. – Vol.13. –P. 503-506. doi:10.2147/IMCRJ.S268696.
 141. Kim, EK. Establishment of novel limbus-derived, highly proliferative ABCG2+/ ABCB5+ limbal epithelial stem cell culture / EK. Kim, GH. Lee, B. Lee [et al.] // Stem Cell Int. – 2017. – Vol.2017. doi: 10.1155/2017/7678637.
 142. Krichevckaia, G.I. Viral and non-viral infections in the etiopatogenesis of uveitis / G. I. Krichevckaia, L.A. Katargina // Vestnik Ophthalmologii. – 2020. – Vol. 136. – P. 124-129. (In Russ.).<https://doi.org/10.17116/oftalma2020136011124>
 143. Krishna, L. Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate / L. Krishna, K. Dhamadaran, C. Jayadev [et al.] / Stem cell Res. Published online. – 2016. – Vol.7. – P.188. doi:10.1186 /s13287-016-0440-y.
 144. Le, Q. The application of human amniotic membrane in the surgical management of limbal stem cell deficiency / Q. Le, SX. Deng // Ocul Surf. – 2019. – Vol.17. – P. 221-229. doi:10.1016/j.jtos.2019.01.003.
 145. Leal-Marin, S. Human amniotic membrane: a review on tissue engineering, application, and storage / S. Leal-Marin, T. Kern, N. Hoffmann [et al.] // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2021. – Vol.109. – P.1198-1215. doi:10.1002/jbm.b.34782.
 146. Li, G. Human limbal niche cells are a powerful regenerative source for the prevention of limbal stem cell deficiency in rabbit model / Li G., Zhang Y., Cai

- S., [et al.] // *Sci Rep.* – 2018. – Vol.26. – P.6566. doi:10.1038/s41598-018-24862-6. PMID: 29700361
147. Li, R. Preservation of cell-based immunotherapies for clinical trials / R. Li, R. Johnson, G.Yu [et al.] // *Cytotherapy.* – 2019. – Vol.21. – P.93-957. doi:10.1016/j.jcyt.2019.07.004. PMID:3146704
 148. Li, Y. Molecular characteristics and distribution of adult human corneal immune cell types / Y. Li, J. Jeong, W. Song // *Front Immunol.* – 2022. – Vol.13. doi:10.3389/fimmu.2022.798346.
 149. Lin, Hsuan-Chieh. Using Optical tomography to assess the role of age and region in corneal epithelium and palisades of Vogt / Hsuan-Chieh Lin, T. B. Tew, Yi-Ting Hsieh [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2016. – Vol.95. doi:10.1097/MD.0000000000004234.
 150. Liu, XN. Corneal stromal mesenchymal stem cells: reconstruction a bioactive cornea and repairing the corneal limbus and stromal microenvironment / N Liu, SL Mi, Y. Chen [et al.] // *Int J Ophthalmol.* – 2021. –Vol.14. – P.448-455. doi:10.18240/ijo.2021.03.19.
 151. Loeser, R. Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage / R. Loeser // *Matrix Biology.* – 2014. – Vol. 39. – P. 11–16.
 152. Lotze, M. T. Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice / M.T. Lotze, A. W. Thomson; Academic Press. – 2011. – P. 736.
 153. Lynn, A. K. Antigenity and immune-denicity of collagen / A. Lynn, I.V.Yannas, W. Bomfield // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2004. – Vol.71. – P.343-353.
 154. Mamede, A. Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications / A. Mamede, M. Botelho // Springer. – 2015. – P. 254.
 155. Masood, F. Therapeutic strategies for restoring perturbed corneal epithelial homeostasis in limbal stem cell deficiency: current trends and future direction / F. Masood, JH. Chahg, A. Akbar [et al.] // *Cells.* – 2022. – Vol.11. – P. 3247. doi:10.3390/cells11203247.

156. Masson-Meyers, D.S. Oral mucosa equivalents, prevascularization approaches, and potential applications / D.S. Masson-Meyers, L.E. Bertassoni, L. Tayebi // *Connect Tissue Res.* – 2022. – Vol.63. – P.514-529. doi:10.1080/03008207.2022.2035375.
157. Mead, O.G. Amniotic membrane transplantation for managing dry eye and neurotrophic keratitis / O. G. Mead, S. Tighe, S.C.G. Tseng [et al.] // *Ophthalmol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 13-21. doi:10.4103/tjo.tjo_5_20. PMID:32309119
158. Meyers, R. Translational Medicine 2 Volume Set: Cancer / R. Meyers // John Wiley & Sons. – 2016. – P. 1100.
159. NaPier, E. Neurotrophic keratopathy: current challenges and future prospects / E. NaPier, M. Camacho, T. McDevitt [et al.] // *Ann Med.* – 2022. – Vol.54. – P.666-673. doi:10.1080/07853890. 2022.205035.
160. Nam, S.M. Ex vivo Expansion of human limbal epithelial cells using human placenta –derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells / S.M. Nam, Y-S. Maeng, E.K. Kim [et al.] // *Stem cells Int.* – 2017. –Vol.2017. doi:10.1155/2017/4206186.
161. Nema, H.V. Recent Advances in Ophthalmology – 10 / H.V. Nema, N. Nema, J.L. Alio [et al.] // JP Medical Ltd. – 2015. – Vol.12. – P.404.
162. Ni, N. Use of adjunctive topical corticosteroids in bacterial keratitis /N. Ni., M. Srinivasan, S. McLeod [et al.] // *Curr Opin Ophthalmol.* – 2016. – Vol.27. – P.353-357. doi:10.1097/ICU. 0000000000000273.
163. Nieto-Nicolau, N. Xenofree generation of limbal stem cells for ocular surface advanced cell therapy / N. Nieto-Nicolau, E. Martínez-Coesa, A. Velasco-García [et al.] // *Stem cell Res Ther.* – 2019. – Vol.10. – P.374. doi:10.1186/s13287-019-1501-9.
164. Nili, E. The impact of limbal mesenchymal stromal cells on healing of acute ocular surface wounds is improved by pre-cultivation and implantation in the presence of limbal epithelial cells / Nili E., Li F.J., Dawson R.A., [et al.] //

- Cell Transplant. – 2019. – Vol.28. – P. 1257-1270. doi:10.1177/0963689719858577. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31208228
165. Nishida, T. Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin–integrin interactions / T. Nishida, M. Inuic, M. Nomizud // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2015. – Vol. 47. – P. 38–63.
 166. Ortega, I. Combined microfabrication and electrospinning to produce 3-D architecture for corneal repair / I. Ortega, A. Ryan A., P. Deshpande [et al.] // *Acta Biomater.* – 2013. – Vol.9. –P. 5511-5520. doi:10.1016/j. actbio. 2012. 10.039.
 167. Pandey, K. Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes phosphoinositide hydrolysis, Ca²⁺ release, and activation of protein kinase C / K. Pandey // *Front Mol Neurosci.* – 2014. – V.7. – P. 75. doi:10.3389/fnmol.2014.00075.
 168. Petrenko, Y. Cryopreservation of Mesenchymal Stromal Cells within Wide-Porous Three-Dimensional Alginate-Gelatin Scaffolds / Y. Petrenko, A. Katsen-Globa, [et al.] // *Probl Cryobiol Cryomed.* – 2013. – № 23(4). – C.351–354.
 169. Polisetti, N. A decellularized human limbal scaffold for limbal stem cell niche reconstruction / N. Polisetti, B. Roschinski, U. Schlötzer-Schrehardt [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol.22. – P.10067. doi:10.3390/ijms221810067.
 170. Polisetti, N. Isolation and ex vivo expansion of limbal mesenchymal stromal cells / Polisetti N., Sharaf L., Reinhard T., [et al.] // *Bio Protoc.* – 2022. – Vol.12. doi:10.21769/BioProtoc.4471. PMID: 35978577
 171. Ramos, T. Specific decellularized extracellular matrix promotes the plasticity of human ocular surface epithelial cells / T. Ramos, M. Parekh, P. Meleady [et al.] // *From Med (Lausanne)*. – 2022. – Vol.9. doi:10.3389/fmed.2022.974212.
 172. Ravani, R.D. Experimental evaluation of safety and efficacy of plasma-treated poly-ε-caprolactone membrane as a substitute for human amniotic membrane in treating corneal epithelial defects in rabbit eyes / R.D. Ravani, S.

- Yadav, B. Takkar [et al.] // Indian J Ophthalmol. – 2021. – Vol.69. – P.2412-2416. doi:10.4103/ijo.IJO_2986_20.
173. Resende, R. Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research / R. Resende, He. Ulrich // Springer Science & Business Media. – 2013. – P. 661.
 174. Resnik, R. Creasy and Resnik's Maternal-Fetal Medicine: Principles and Practice / R. Resnik, C.J. Lockwood, T.M. Moore [et al.] // Elsevier Health Sciences. – 2019. – P.1388.
 175. Romo-Valera, C. Characterisation of corneas following different time and storage methods for their use as a source of stem-like limbal stem cells / C. Romo-Valera, M. Pérez-Garrastachu, R. Hernáez-Moya [et al.] // Exp Eye Res. – 2021. – Vol.211. doi:10. 1016/j.exer. 2021. 108720. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34389315
 176. Ruan, Y. Corneal epithelial stem cells- physiology, pathophysiology and therapeutic options / Y. Ruan, S. Jiang, A. Musayeva [et al.] // Cells. – 2021. – Vol.10. – P. 2302. doi:10.3390/cells10092302. PMID: 34571952
 177. Röck, T. Amniotic membrane transplantation in reconstructive and regenerative ophthalmology / Röck T., Bartz-Schmidt K.U., Landenberger J., [et al.] // Ann Transplant. – 2018. Vol. 23. – P. 160-165. doi:10.12659/AOT.906856. PMID: 29507278
 178. Scadden / Nice neighborhood: emerging concepts of stem cell niche. Cell. 2014. 157: 41-50.
 179. Sehgal, P. LncRNA VEAL2 regulates PRKCB2 to modulate endothelial permeability in diabetic retinopathy /P. Sehgal, S. Mathew, A. Sivadas [et al.] // EMBO J. – 2021. – Vol.40. P.107134. doi: 10.15252/embj.2020107134.
 180. Selver, O. Corneal recovery in a rabbit limbal stem cell deficiency model by autologous grafts of tertiary outgrowths from cultivated limbal biopsy explants / O. Selver, I. Durak, M. Gürdal [et al.] // Molecular Vision. – 2016. – № 22. – P.138-149.
 181. Shanbhag, S.S. Autologous limbal stem cell transplantation: a systematic review of clinical outcomes with different surgical techniques / S.S. Shanbhag,

- N. Nikpoor N., P.R. Donthineni [et al.] // Br J Ophthalmol. – 2020. – Vol.104. – P.247-253. doi:10.1136/bjophthalmol-2019-314081.
182. Sharma, N. Treatment of acute ocular chemical burns / N. Sharma, M. Kaur, T. Agarwal [et al.] // Surv Ophthalmol. – 2018. – Vol.63. – P.214-235. doi:10.1016/j.survophthal. 2017.09.005. PMID:28935121
 183. Sharma, S. Surface-modified electrospun poly (epsilon-caprolactone) scaffold with improved optical transparency and bioactivity for damaged ocular reconstruction / S. Sharma, D. Gupta, S. Mohanty [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2014. – Vol. 55. – P. 899-907.
 184. Sheth, R. Culture and Characterization of oral mucosal epithelial cells on a fibrin gel for ocular surface reconstruction /R. Sheth, M. H. Neale, A.J. Shortt [et al.] // Published online. – 2014. – P.1077-1087.
 185. Shivalingappa, K. Swamynathan. Ocular Surface Development and Gene Expression / K. Swamynathan Shivalingappa // Journal of Ophthalmology. – 2013. – Vol.2013. – P. 22.
 186. Shukla, S. Limbal epithelial and mesenchymal stem cell therapy for corneal regeneration / S. Shukla, S. Shanbhag, F. Tavakkoli [et al.] // Curr Eye Res. – 2020. – Vol.45. – P.265-277. doi: 10.1080/02713683.2019.1639765.
 187. Sidney, L. Effect of culture medium on propagation and phenotype of corneal stroma-derived stem cells / L. Sidney, M. Bransh, H. Dua [et al.] // Cytotherapy. – 2015. – Vol.17. – P.1706-1722. Doi: 10.1016/j.cyt.2015.08.003.
 188. Singh, A. Mini-Review: Regenerating the corneal epithelium with simple limbal epithelial transplantation / A. Singh, V.S. Sangwan // Front Med (Lausanne). – 2021. – Vol. 28. doi:10.3389 /fmed. 2021.673330.
 189. Skorecki, K. Brenner and Rector's The Kidney / K. Skorecki, G. Chertow, P. Marsden, [et al.] // Elsevier Health Sciences. – 2015. – P.2784.
 190. Smeringaiova, I. Ex vivo expansion and characterization of human corneal endothelium for transplantation: a review / I. Smeringaiova, TP. Utheim, K. Jirsova // Stem Cell Res Ther. – 2021. – Vol.12. – P. 54. doi: 10.1186/s13287-021-02611-3.

191. Spaniol, K. Generation and characterization of decellularised human corneal limbus / K. Spaniol, J. Witt, S. Mertsch [et al.] // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2018. – Vol.256. – P. 547-557. doi: 10.1007/s00417-018-3904-1.
192. Srivastava, R. Stem Cells and Human Diseases /R. Srivastava, S. Shankar// *Springer Science & Business Media.* – 2012. – P. 630.
193. Stadnikova, A. Interleukin-13 maintains the stemness of conjunctival epithelial cell cultures prepared from human limbal explants / A. Stadnikova, P. Trosan, P. Skalicka [et al.] // *PloS One.* – 2019. – Vol. 14. doi: 10.1371/journal.pone.0211861.
194. Stanescu, D. Random coefficient differential models of growth of anaerobic photosynthetic bacteria / D. Stanescu, B. Cheh- Charpentier, B J. Jensen [et al.] // *Electronic Transactions on Numerical Analysis.* – 2009. – Vol.34. – P.44-58.
195. Stefan, J. Lang. Simultaneous transplantation of limbal stem cells may reduce recurrences of granular dystrophy after corneal / Lang Stefan J., P. Eberwein, H. Reinshagen, [et. al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2015. – Vol.94. – P. 789.
196. Steinhoff, G. Regenerative Medicine: From Protocol to Patient / G. Steinhoff // *Springer Science & Business Media.* – 2013. – P.1220.
197. Suzuki, S. The Cadherin Superfamily: Key Regulators of Animal Development and Physiology / S. Suzuki, S. Hirano // *Springer.* – 2016. – P. 428.
198. Suárez-Barrio, C. Hyaluronic acid combined with serum rich growth factors in corneal epithelial defects / C. Suárez-Barrio, J. Etxebarria, R. Hernáez-Moya [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2019. –Vol. 20(7). P.1655. doi: 10/3390/ijms20071655.P
199. Tavassoly, I. Dynamics of Cell Fate Decision Mediated by the Interplay of Autophagy and Apoptosis in Cancer Cells: Mathematical Modeling and Experimental Observations / I. Tavassoly // *Springer.* – 2015. – P. 79.

200. Tehrani, D. A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications / D. Tehrani, A. Firouzeh, I. Shabani [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2021. – Vol.8. doi: 10.3389/fbioe.2020.606982.
201. Tobias, K. *Veterinary Surgery: Small Animal: 2-Volume Set* / K. Tobias, S. Johnston // Elsevier Health Sciences. – 2013. – P.2332.
202. Trufanov, S.V. Surgical management of infectious keratitis / S.V. Trufanov, N.P. Shakhbazyan, A.V. Zaitsev [et al.] // *Vestn Oftalmol.* – 2021. – Vol.137. – P.128-135. doi: 10.17116/oftalma2021137041128.
203. Tsai, R. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells / R. Tsai, L. Li, J. Chan // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 343. – P.86-93. doi: 10.1056/NEJM200007133430202
204. Tseng, S. Concept and application of limbal stem cells / S. Tseng // *Eye (Lond.)*. – 1989. – Vol. 3 (Pt 2). – P.141-157.
205. Turksen, K. *Adult Stem Cells* / K. Turksen // Springer Science & Business. – 2014. – P. 429.
206. Turksen, K. *Tissue-Specific Stem Cell Niche* / K. Turksen // Springer. – 2015. – P. 328.
207. Tvorogova, A. Dynamic microtubules drive fibroblast spreading / A. Tvorogova, A. Saidova, T. Smirnova [et al.] // Published by the company of biologists ltd. – 2018. – Vol.7. doi:10.1242/bio038968
208. Ung, L. Foundational concepts in the biology of bacterial keratitis / L. Ung, J. Chodosh // *Exp Eye Res.* – 2021. – Vol.209. doi: 10.1016/j.exer.2021.
209. Utheim, T. P. Concise Review: altered versus unaltered amniotic membrane as a substrate for limbal epithelial cells / T.P. Utheim, Ø. A. Utheim, P. Salvanos, [et al.] // *Stem cells Transl Med.* – 2018. – Vol.7. –P.415-427. doi: 10.1002/sctm. 17-0257.
210. Venugopal, R. Outcomes of cultivated oral mucosal epithelial transplantation in eyea with chronical Steven-Jonson syndrome sequelae / R. Venugopal, R. Nagpal, S. Mohanty [et al.] // *Am J Ophthalmol.* – 2021. – Vol.222. – P.82-91. doi: 10.1016/j.ajo.2020.08.022.

211. Watt F., Hogan B. / Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. – 2000. 287: 1427-1430.
212. Wei, C. The NLRP3 inflammasome regulates corneal allograft rejection through enhanced phosphorylation of STAT3 / C. Wei, L. Ma, H. Chi [et al.] // *Am J Transplant*. – 2020. – Vol.20. – P. 3354-3366. doi: 10.1111/ajt.16071.
213. Whaley, D. Cryopreservation: An overview of principles and cell-specific considerations / D. Whaley, K. Damyar, R.P. Witek [et al.] // *Cell Transplant*. – 2021. – Vol.30. doi: 10.1177/096368972199617
214. Whitel, L.J. Hydrogels of decellularized matrix / L.J. Whitel, L.T. Saldin, T.J. Keane [et al.] // *ScienceDirect. Comprehensive Biomaterials II*. – 2017. – Vol.2. – P. 532-431. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09313-9>
215. Wilson, SE. Bowman's layer in the cornea- structure and function and regeneration / Wilson SE. // *Exp Eye Res*. – 2020. – Vol.195. –P.108033. doi: 10.1016/j.exer.2020.108033.
216. Xing, C., Munro T. et al. Thermophysical properties of the Dragline silk of *Nephila clavipes* Spider / C. Xing, T. Munro, B. White [et al.] // *Polymer*. – 2014. – Vol. 55. – P. 4226-4231.
217. Yang, V. Intestinal Tumorigenesis: Mechanisms of Development & Progression /V. Yang, A. Bialkowska // *Springer*. – 2015. – P. 445.
218. Yazdanpanah, G. Emerging approaches for ocular surface regeneration / G. Yazdanpanah, S. Jabbehdari, Ali R. Djalilian // *SpringerLink. Reg Med*. – 2019. –Vol.7. - P.1-10. doi: 10.1007/s40135-019-00193-1.
219. Yuan, X. Ocular Drug Delivery Nanowafer with Enhanced Therapeutic Efficacy / X. Yuan, D. Marcano, C. Shin [et. al.] // *ACS Nano*. – 2015. – Vol.9 (2). – P.1749–1758. doi: 10.1021/nn506599f.
220. Zachary, J. Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult / J. Zachary, M. McGavin // *Elsevier Health Sciences*. – 2016. – P. 1408.
221. Zeibig, E. Clinical Parasitology: A Practical Approach / E. Zeibig // *Elsevier Health Sciences*. – 2014. –P.384.

- 222. Zhang, L. An Ultra-thin Amniotic Membrane as Carrier in Corneal Epithelium Tissue - Engineering / L. Zhang, D. Zou, S. Li [et al.] // Sci Rep. – 2016. – Vol.6. – P.21021. doi: 10.1038/srep21021.
- 223. Zhang, S. Comparative analysis of KnockOut™ serum with fetal bovine serum for the in vitro long-term culture of human limbal epithelial cells / S. Zhang, Z. Liu, G. Su [et al.] // Journal of Ophthalmology. – 2016. – P. 10.
- 224. Zhao, Z. Silk fibroin-Based Nanoparticles for drug delivery / Z. Zhao, Yi. Li., Mao-Bib Xie // Int J Mol Sci. Published online. – 2015. – Vol.16. – P.4880-903.

