

На правах рукописи

Шахбазян Наре Петросовна

**ЛЕЧЕНИЕ ПЕРСИСТИРУЮЩЕГО ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ДЕФЕКТА
ПОСЛЕ КЕРАТОПЛАСТИКИ С ПОМОЩЬЮ ДЕРИВАТОВ
АУТОКРОВИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.5. – Офтальмология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Труфанов Сергей Владимирович

Официальные оппоненты:

Калинников Юрий Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения РФ, профессор кафедры глазных болезней

Оганесян Оганес Георгиевич, доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, ведущий научный сотрудник отдела травматологии и реконструктивной хирургии

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится 18 апреля 2022г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.174.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней» по адресу: 119021, Москва, ул.Россолимо, д.11 А, Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.niigb.ru Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

М.Н. Иванов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Персистирующий эпителиальный дефект роговицы (ПЭД, persistent corneal epithelial defects) представляет собой стойкое, незаживающее поражение эпителия, сохраняющееся более двух недель на фоне стандартной репаративной терапии (Vaidyanathan U. et al., 2019, McCulley J. et al., 1993, Dua H. et al., 1994, Гундорова Р.А. с соавт., 1998). Зачастую такие дефекты возникают на поверхности кератотрансплантата (Макаров П.В. с соавт., 2015). Увеличение срока эпителизации после кератопластики сопряжено с множеством осложнений и может явиться одной из причин несостоятельности трансплантата, что значительно снижает шансы его прозрачного приживления (Coster D. et al., 2005).

Процесс восстановления эпителиального слоя роговицы включает в себя ряд согласованных событий, где факторы роста и цитокины играют важную роль в регулировке процессов заживления и поддержания гомеостаза раны. Уровень факторов роста и цитокинов определяется активностью их синтеза эпителиальными клетками, стромальными кератоцитами, лейкоцитами, а также клетками слезной железы. Миграция, пролиферация и адгезия являются частью непрерывного процесса, вклад каждого из них варьируется в зависимости от размера, глубины и характера травмы. Так, при повреждении эпителия роговицы высвобождаются воспалительные цитокины, такие как ФНО- α и ИЛ-1. Кератоциты в ответ на это синтезируют факторы роста, причем изменение в этом строго регулируемом процессе может привести к ненормально замедленному заживлению эпителиальной раны. Некоторые исследования предполагают, что ИЛ-1 и ФНО- α прямо или косвенно модулируют апоптоз кератоцитов, вызывают выработку ММП, а также переход кератоцитов из покоящегося фенотипа в активированный. Из-за нарушения базальной мембраны эпителиальные клетки активно продуцируют TGF- β 2, вызывающий трансформацию кератоцитов в миофибробласты, секретирующие

внеклеточный матрикс. Когда же формирование полноценной базальной мембраны завершается, то ее наличие ингибирует выработку TGF- β 2 и миофибробластный переход кератоцитов (Lu L., 2001, Ljubimov A.V., 2015). В настоящее время в ткани роговицы обнаружено восемь различных (1,2,3,7,9,10,13,14 типов) ММП (Wong et al., 2002). В нормальной ткани роговицы ММП в основном существуют в виде следовых количеств неактивных зимогенов. При повреждении роговицы возникает воспаление за счет увеличения уровня провоспалительных интерлейкинов, выделяется большое количество протеолитических ферментов, в том числе ММП. Изучение ММП-2 и -9 типов обусловлено их ключевой ролью в деградации и ремоделировании коллагена 4 типа – основного компонента базальной мембраны (Afonso A. A., 1999, Sivak, Fini, 2002). Как известно, аномальная секреция ММП лежит в основе патогенеза многих заболеваний роговичной поверхности, сопряженных с нарушением базальной мембраны, и повышает риск развития ПЭД. Задержка эпителизации приводит к длительной высокой активности протеолитических ферментов, следствием чего может быть расплавление или изъязвление роговицы вплоть до ее перфорации. Все вышесказанное применимо и к случаям длительной эпителизации кератотрансплантата.

В настоящее время для лечения ПЭД широко применяются слезозаменители и лубриканты (гидроксипропилметилцеллюлоза, поливиниловый спирт, повидон и гиалуронат натрия), метод тарзорафии (Donnenfeld E., 1991), окклюзия слезных точек, бандажные МКЛ (Thoft R., 1981; Gasset A. and Kaufman H., 1971; Haung F.C., 2002; Lambiase A., 2016), лечебные покрытия из биологических и искусственных материалов (Jirsova K., 2017; Lee S., 1997; Каспаров А. с соавт., 2006), однако данные методы не всегда приводят к желаемому результату.

На протяжении последних десятилетий для усиления естественных репаративных механизмов организма активно применяются аутологичные производные крови (Tsubota K., 1999; Geerling G., 2004; Cho Y., 2013;

Lekhanont K.,2013). Наибольшее распространение в качестве адьюванта для заживления ран получила обогащенная тромбоцитами плазма (ОбТП, platelet-rich plasma) и ее производные, эффективность которых, вероятно, реализуется за счет высокого содержания факторов роста в α -гранулах тромбоцитов (Alio J.L.,2007; Anitua E.,2015; López-Plandolit S.,2010; Mohammed A., 2019).

Имеются единичные сообщения о применении тромбоконцентратов в лечении ПЭД после различных модификаций кератопластики для ускорения репарации эпителиального дефекта.

Учитывая вышеизложенное, определение безопасности и эффективности применения обогащенной тромбоцитами плазмы и ее производных в лечении ПЭД является актуальным и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования

Экспериментально-клиническая оценка эффективности препаратов на основе обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении персистирующего эпителиального дефекта роговицы после различных модификаций кератопластики.

Задачи исследования

1. Исследовать влияние различных дериватов крови (сыворотки, обогащенной тромбоцитами плазмы, лизата обогащенной тромбоцитами плазмы) на процессы миграции, пролиферации, клеточной гибели *in vitro* на двух типах культур – первичной и иммортализованной, и на основе полученных экспериментальных данных определить наиболее эффективный и безопасный состав для терапии персистирующего эпителиального дефекта после кератопластики.
2. Изучить уровень продукции ММП-2 и -9 типов и ФНО- α клетками эпителия роговицы *in vitro* в условиях, моделирующих воспалительное окружение, и в норме.

3. Выяснить, влияет ли добавление различных дериватов крови на уровень продукции ММП-2 и -9 типов и ФНО- α клетками эпителия роговицы *in vitro* в условиях, моделирующих воспалительное окружение, и в норме.

4. Оценить безопасность и терапевтическую эффективность применения инстилляций выбранного состава на основе производных крови для лечения пациентов с персистирующим эпителиальным дефектом после различных модификаций кератопластики при неэффективности стандартной репаративной терапии.

5. Оценить влияние срока полной эпителизации на состояние роговичного трансплантата.

Научная новизна

- Впервые проведено сравнительное исследование влияния сыворотки, обогащенной тромбоцитами плазмы, лизата обогащенной тромбоцитами плазмы на миграцию, пролиферацию и гибель клеток в первичной клеточной культуре эпителия роговицы и иммортализованной культуре карциномы кожи a431 *in vitro*.

- Оценена эффективность применения лизата обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении персистирующего эпителиального дефекта не только после сквозной, но и различных модификаций передней и задней послойной кератопластик.

- Изучено влияние производных крови (сыворотки, обогащенной тромбоцитами плазмы, лизата обогащенной тромбоцитами плазмы) на продукцию ММП-2 и -9 типов, ФНО- α в первичной клеточной культуре роговичного эпителия в условиях, моделирующих воспалительное окружение, и в норме.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Доказана клиническая эффективность применения дериватов крови на основе тромбоконцентратов в лечении пациентов с ПЭД после различных модификаций кератопластики. На основе полученных экспериментальных данных был предложен наиболее «перспективный» состав для терапии.

2. Оценено влияние различных производных крови на уровень продукции ММП - 2 и - 9 типов, ФНО- α клетками первичной культуры роговичного эпителия в условиях, моделирующих воспалительное окружение, и в норме. Что подтверждает безопасность их применения после кератопластики.

3. Доказана клиническая эффективность применения дериватов крови на основе тромбоконцентратов как адъювантный метод в лечении пациентов с ПЭД после различных модификаций кератопластики.

Внедрение в практику

Разработанный метод внедрен в клиническую практику отдела патологии оптических сред глаза ФГБНУ «НИИ Глазных болезней».

Методология исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось применение комплекса методов научного познания. Настоящее диссертационное исследование выполнено в соответствии с принципами научного исследования и исполнено в дизайне когортного проспективного исследования с применением клинических, инструментальных, аналитических и статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Исследованные производные крови (обогащенная тромбоцитами плазма, лизат обогащенной тромбоцитами плазмы и сыворотка) стимулируют процессы миграции и пролиферации клеток *in vitro*. Наибольшим эффектом при этом обладает лизат обогащенной тромбоцитами плазмы. Также для него характерно антиапоптотическое действие. Это свидетельствует в пользу того, чтобы рекомендовать лизат обогащенной тромбоцитами плазмы для клинической апробации.

2. Исследованные производные крови *in vitro* не увеличивают уровень ММП (ответственных за деградацию матрикса) и медиатора воспаления ФНО- α в культуре эпителия *in vitro*, а значит, будут безопасны при применении у пациентов с поврежденным эпителием после кератопластики.

3. Разработанная методика консервативного лечения персистирующего эпителиального дефекта с помощью глазных капель лизата обогащенной тромбоцитами плазмы способствует безопасному и эффективному заживлению эпителиального дефекта роговицы после различных модификаций кератопластики.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в обследовании пациентов до и после оперативного лечения, ведение пациентов с ПЭД в послеоперационном периоде, активном участии в подготовке и проведении экспериментального исследования, апробации результатов, подготовке публикаций по теме диссертационной работы. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов выполнены лично автором.

Степень достоверности исследования

Степень достоверности проведенных экспериментальных и клинических исследований определяется результатами полученных лабораторных данных, подтверждена в процессе статистической обработки полученных данных, а также репрезентативным объемом материала, достаточным для выполнения поставленных задач. Анализ и статистическая обработка данных проведены с применением современных методов.

Апробация результатов диссертационного исследования

Результаты исследования обсуждены на Научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы офтальмологии» (Москва, 2020), а также на заседании проблемной комиссии ФГБНУ «НИИ глазных болезней».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, 6 из них входят в перечень рецензируемых журналов и изданий, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертационного исследования

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материала и методов, результатов

собственных исследований, изложенных в 4 главах, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 31 отечественных и 200 иностранных источников, иллюстрирована 11 таблицами, 10 графиками и 33 рисунками.

Содержание работы

Работа выполнена на базе ФГБНУ «НИИ глазных болезней». Исследование состоит из двух основных частей: экспериментальной и клинической.

Материалы и методы экспериментальной части исследования

Экспериментальные исследования проводились на базе группы клеточных технологий лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ «НИИ Глазных болезней».

Получение и характеристика клеточных культур

Первичная клеточная культура эпителия роговицы человека была получена из кадаверного материала – корнео-склерального кольца, не востребованного в ходе кератопластики, эксплантным методом. Поверхность культурального пластика была покрыта фибронектином (1мкг/см²). Клетки выращивались на бессывороточной среде K-SFM (Gibco, США), в стандартных условиях (37° С, 5 % CO₂, и 100% влажности). Смена среды осуществлялась раз в 2-3 дня, по достижении конfluence проводилось пассирование. В исследовании были использованы клетки третьего пассажа. Для подтверждения роговичной принадлежности их типировали на характерные цитокератины (СК) 3 и 19 типов, для оценки уровня пролиферации проводили иммуноцитохимическое окрашивание на белок-маркер пролиферации Ki67.

Иммортализованная культура карциномы кожи а431 была любезно предоставлена институтом регенеративной медицины МГУ.

Клетки линии а431 выращивались на среде RPMI (Gibco, США) с 10% FBS, в стандартных условиях (37° С, 5 % CO₂, и 100% влажности). Смена среды осуществлялась раз в 2-3 дня, по достижении конfluence проводилось пассирование. Перед оценкой регенераторного потенциала производных

крови проводилась суточная депривация клеток по сыворотке, т.е. использовалась питательная среда без добавления FBS (Fetal Bovine Serum).

Характеристика исследуемых производных крови

Для экспериментальной части исследования использовали обогащенную тромбоцитами плазму (ОбТП), лизат обогащенной тромбоцитами плазмы (лизат ОбТП) и сыворотку, полученные из венозной крови здоровых добровольцев.

Экспериментальное исследование регенераторного потенциала производных крови (ОбТП, лизата ОбТП и сыворотки) на клеточных моделях - первичной культуре эпителия роговицы человека и иммортализованной культуре карциномы кожи а431

Для оценки эффекта в ростовую среду добавляли исследуемые стимуляторы – ОбТП, лизат ОбТП, сыворотку в концентрации 10% от объема, в контрольную группу – только ростовую среду.

Для исследования влияния стимуляторов на пролиферацию был проведен колориметрический формазановый MTS тест, отражающий уровень метаболической активности исследуемых клеток. Живые активные клетки метаболизируют неокрашенный реактив CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) в окрашенную форму. Таким образом, светопропускание в лунке планшета пропорционально количеству живых клеток в ней. Коэффициент пропускания измеряли на фотометре Muliscan-FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 490нм.

Для исследования влияния на миграцию был проведен тест на заращивание раны монослоя. Динамику заживления – расстояние между краями раны – оценивали на изображениях, полученных с микроскопа AxioVert A1 с фотокамерой Canon 600D через 6, 17 и 24 часа после внесения стимуляторов.

Для оценки клеточной гибели (апоптоза и некроза) в культуре клеток использовали набор ApoDETECT Annexin V-FITC (Invitrogen, США). Анализировали окрашенные клетки с помощью микроскопии в темном поле

с длиной возбуждения флуоресценции 450-490 нм и эмиссии 515 для регистрации сигнала FITC, для PI длина возбуждения была 548 нм, эмиссии 590 нм, и в светлом поле с фазовым контрастом.

Исследование продукции ММП-9, ММП-2, ФНО- α первичной клеточной культурой роговичного эпителия и влияния исследуемых производных крови на их уровень в условиях, моделирующих воспалительное окружение, и в норме

Для создания условий, имитирующих локальное воспаление, к клеткам первичной культуры, был добавлен провоспалительный цитокин ИЛ-1 β (ARA563Hu01) Cloud-Clone Corp. в концентрации 10нг/мл за сутки до тестирования стимуляторов.

- 1) Через сутки среда была собрана для оценки уровней ММП-9, ММП-2 и ФНО- α .
- 2) К стимулированным и не стимулированным клеткам были внесены дериваты крови, и через сутки собрана среда, в которой оценивали уровни ММП-9, ММП-2 и ФНО- α .

Исследование кинетики высвобождения ММП-9, ММП-2 и ФНО- α из ОБТП

Из всех тестируемых продуктов крови синтетически активные клетки (лейкоциты) потенциально могут присутствовать только в ОБТП, поэтому мы оценили какое количество ММП-9, ММП-2 и ФНО- α высвобождается из нее через 24, 48 и 72 часа.

Во всех экспериментальных исследованиях содержание ММП-9, ММП-2 и ФНО- α оценивали методом твердофазного ИФА (ELISA). До исследования все образцы (супернатанты клеточных культур) хранились при температуре -20 °C.

Материал и методы клинической части исследования

В исследование были включены 60 пациентов (60 глаз) с персистирующим эпителиальным дефектом, после различных модификаций кератопластики. Пациенты после планового хирургического вмешательства до включения в

исследование получали стандартную медикаментозную терапию, применяемую после кератопластики.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Плановая кератопластика по поводу: эндотелиальной дистрофии Фукса, псевдофакичной буллезной кератопатии, стромальных дистрофии роговицы; кератоконуса 3-4 стадии по Amsler-Krumeich; стромальных помутнений различной этиологии; непрозрачного приживления трансплантата после кератопластики.
2. Отсутствие завершенной эпителизации роговицы после проведенной плановой кератопластики в течение более 14 дней на фоне стандартной репаративной терапии.
3. Отсутствие тяжелой соматической патологии и хронических гемотрансмиссивных инфекций.
4. Наличие добровольного информированного согласия пациента на клиническое исследование.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Экстренное хирургическое вмешательство вследствие острых воспалительных заболеваний роговицы.
2. Тяжелая соматическая патология.
3. Наличие клинических признаков тканевого отторжения.
4. Несоблюдение назначенного терапевтического режима и сроков явки, для оценки эффективности терапии и динамического наблюдения.
5. Наличие сопутствующих тяжелых офтальмологических заболеваний, в частности далекозашедшей глаукомой и рефрактерной глаукомы, синдрома Стивенса-Джонсона, болезни Шегрена, изменений век, признаков лимбальной недостаточности.

В исследовании принимали участие 60 пациентов, из них 25 женщин и 35 мужчин. Средний возраст больных составил $67,8 \pm 11,9$. Пациентам выполнялись различные виды кератопластики.

Пациенты были в случайном порядке разделены на две группы:

- **1 группа (n=26) – контрольная** – включала пациентов с ПЭД после кератопластики, получающие только стандартный курс медикаментозной терапии и БМКЛ по переносимости;
- **2 группа (n=34) – основная** – включала пациентов с ПЭД после кератопластики, получающие на фоне стандартной терапии дополнительное лечение начиная с 15-х послеоперационных суток.

Схема лечения в группах представлена в Таблице 1.

Таблица 1. Схема лечения в группах

Этап лечения	1 группа	2 группа
<i>1 – й этап терапии - стандартная терапия (14 дней)</i>	- Тобрамицин 0,3% - по 1 кап. х 4 раза в день в течение 1 мес; замену антибактериальных капель антисептиком проводили на 4-й неделе терапии; - Дексаметазон 0,1% - по 1 кап. х 6 раз в день далее по убывающей схеме (1 кап. х 5 раз в день; 1 кап. х 4 раза в день и т.д. длительность терапии зависит от вида хирургического вмешательства); - Декспантенол 5% 3 раза в день + заклейки; - Натрия гиалуронат 0,3% по 1 кап. х 4-6 раза в день	
<i>2 – й этап при отсутствии эпителизации на 15 сутки после операции до 12 недель</i>	<i>Второй этап терапии проводили на фоне стандартной</i>	
	- применение бандажной МКЛ по переносимости, замену проводили раз в 2-4 нед.; - отмена препарата на гелевой основе	- капли лизата ОБТП по 1 кап. х 4-5 раз в день

В зависимости от показаний к кератопластике всех пациентов можно разделить на кератопластику «высокого и низкого» риска отторжения трансплантата. Следует отметить, что процент кератопластики «высокого и низкого» риска в группах был сопоставим (график 1).



График 1. Распределение пациентов в группах с «низким» и «высоким» риском отторжения кератотрансплантата

При оценке результатов лечения и в основной, и в контрольной группе оценивали **сроки полной эпителизации**, при этом условно критическим сроком считали отсутствие полной эпителизации в течение 12 недель и более. В этих случаях рассматривали возможность перехода на хирургические методы лечения. Кроме этого, оценивали влияние процесса эпителизации на последующее состояние трансплантата. Срок наблюдения после кератопластики составил от 12 мес. до 18 мес.

Всем пациентам были проведены стандартные предоперационные офтальмологические исследования: визометрия, биомикроскопия, рефрактометрия, офтальмоскопия, тонометрию, пахиметрия, электрофизиологическое исследование (пороговые показатели электрической чувствительности сетчатки и лабильности зрительного нерва, КЧСМ), ультразвуковое исследование глаз.

В дооперационном и послеоперационном периоде пациентам проводили дополнительные методы исследования:

Тест Ширмера1: оценивали в дооперационном периоде и после операции через 1 нед., 4 нед., 6 нед., 12 нед., 6 мес. и 12 мес.

Проба Норна: оценивали стабильность слезной пленки через 3 и 6 месяцев после операции при возможности выполнения.

Фотографирование глаз: проводили на фотоцелевой лампе фирмы TOPCON DC-1 (Япония) в послеоперационный период.

Окраска роговицы флюоресцеином: оценивали площадь эпителиального дефекта в послеоперационном периоде на 15-е сутки и после полной эпителизации.

Оптическая когерентная томография роговицы: выполняли с помощью томографа Optovue, США, оценивали эпителиальный слой на 15-е послеоперационные сутки, после полной эпителизации и в послеоперационном периоде на сроке 3 мес., 6 мес., 9-12 мес.

Оптическая когерентная томография роговицы с составлением

эпителиальной карты: проводили пациентам с ПЭД на 15 сутки после операции с помощью топографа SOCT Copernicus Optopol.

Результаты экспериментальной части исследования

Результаты экспериментального исследования регенераторного потенциала производных крови (ОбТП, лизата ОбТП, сыворотки) на клеточных моделях - первичной культуре эпителия роговицы человека и иммортализованной культуре карциномы кожи а431

Влияние ОбТП, лизата ОбТП, сыворотки на пролиферацию в первичной культуре эпителия роговицы человека. Между исследуемыми группами обнаружены различия в количестве метаболически активных клеток после воздействия стимуляторов (график 2). Количество клеток после 24 часов инкубации с лизатом ОбТП, статистически значимо отличалось от клеток, инкубированных в контрольных условиях, было наибольшим среди всех стимуляторов и статистически значимо ($p < 0,05$) отличалось от клеток, инкубированных в контрольных условиях. Через 48 часов эта тенденция сохранялась - наиболее сильный прирост был зафиксирован в группе с лизатом ОбТП, самый низкий - в группе, стимулированной ОбТП. Стимуляция сывороткой не привела к значимым отличиям показателей от таковых в контрольной группе.

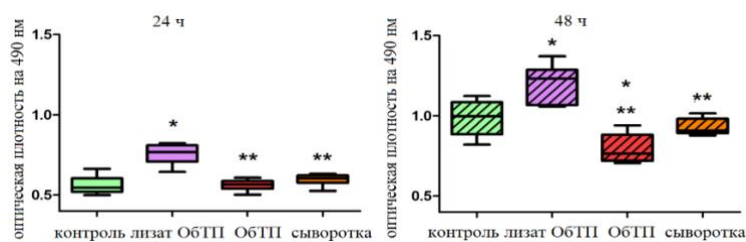


График 2. Количество метаболически активных клеток роговичного эпителия после стимуляции тремя производными крови: сывороткой, ОбТП, лизатом ОбТП. Время инкубации: 24 ч., 48 ч. Оценка пролиферации формазановым тестом в одноступенчатой модификации

Влияние ОбТП, лизата ОбТП, сыворотки на иммортализованной культуре карциномы кожи а431. Количество метаболически активных клеток после воздействия стимуляторов в течение 24 часов не различалось

между группами (График 3). Стимуляция всеми производными не привела к значимым отличиям показателей от таковых в контрольной группе. Однако на следующий день – через 48 часов – различия в количестве клеток стали статистически достоверными ($p < 0,05$): все группы, стимулированные дериватами крови, продемонстрировали большее количество клеток, чем контрольная.

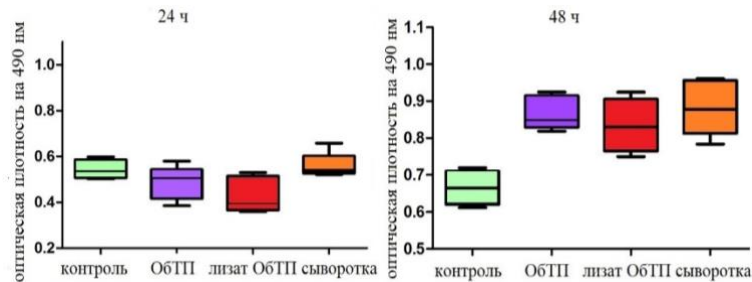


График 3. Количество метаболически активных клеток линии *a431* после стимуляции тремя производными крови: сывороткой, ОБТП, лизатом ОБТП. Время инкубации: 24 ч., 48 ч. Оценка пролиферации формазановым тестом в одноступенчатой модификации

Миграционный тест на первичной культуре эпителия роговицы человека

не выявил значимого различия в скорости закрытия дефекта между группами. К 24-м часам во всех образцах эпителиоциты полностью заполнили оголенную поверхность. Начало активной миграции в группах со стимуляторами было зафиксировано после 6 часов. Однако размер, форма, распластанность клеток в зоне повреждения оказались значительно ближе к характерным для зрелых эпителиоцитов, в группах с добавлением производных крови, нежели в контрольной, где клетки имели более фибробластоподобный фенотип. Это позволяет предположить большую функциональную состоятельность клеточного слоя, сформированного в присутствии производных крови.

Миграционный тест на иммортализованной культуре карциномы кожи

a431 показывает положительное влияние всех производных крови на скорость застания экспериментального дефекта. Однако следует отметить различия в скорости закрытия дефекта между группами – так, клетки, инкубированные с лизатом ОБТП, заполнили всю оголенную поверхность

уже к 24 часам. В лунках с другими стимуляторами для полного закрытия раны потребовалось больше времени.

Оценка клеточной гибели в первичной культуре эпителия роговицы человека. Процент клеток, погибших по механизму быстрой клеточной гибели – *некрозом*, был наиболее высоким в группе, стимулированной сывороткой. В группах, стимулированных продуктами на основе тромбоцитов, таких клеток было достоверно меньше, чем в группе стимулированной сывороткой (график 4-А). При окраске на детекцию программированной клеточной гибели (*апоптоза*), таких клеток, в группе стимулированной лизатом ОБТП было достоверно меньше, чем в группе стимулированной сывороткой (график 4-Б).

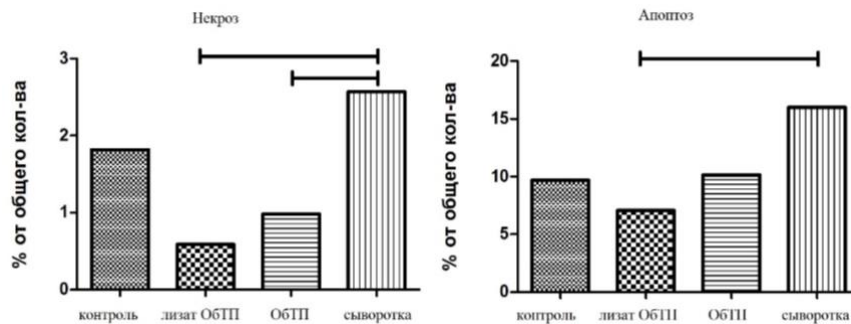


График 4-А. Оценка уровня некроза клеток

График 4-Б. – оценка уровня апоптоза в первичной культуре эпителия роговицы человека при добавлении исследуемых стимуляторов

Оценка клеточной гибели в иммортализованной культуре карциномы кожи а431. Проведенное исследование показывает значимое различие в уровне клеточной гибели в группах с разными стимуляторами. Процент клеток, погибших *некрозом*, был наиболее высоким в группе, стимулированной сывороткой (как и в случае с первичной культурой). В группах, стимулированных продуктами на основе тромбоцитов, количество таких клеток было сопоставимо с контрольными показателями, при этом в группе стимулированной ОБТП, достоверно меньше, чем в группе, стимулированной лизатом ОБТП (график 5-А). Уровень *апоптоза* клеток в группе, стимулированной лизатом ОБТП был достоверно ниже, чем в остальных группах. В группах, стимулированных ОБТП и сывороткой,

количество апоптотических клеток было сопоставимо с контрольной группой (график 5-Б).

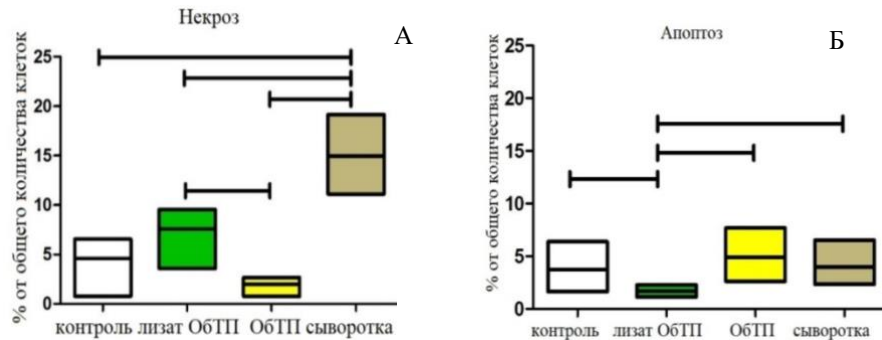


График 5-А. Оценка уровня некроза клеток

График 5-Б. – оценка уровня апоптоза в иммортализованной культуре карциномы кожи a431 при добавлении исследуемых стимуляторов

Результаты исследования продукции ММП- 9, и ММП-2 типов, ФНО-α первичной клеточной культурой роговичного эпителия и влияния на нее исследуемых производных крови в условиях, моделирующих воспалительное окружение и в норме

Обнаружено, что в не стимулированной эпителиальной клеточной культуре уровни ММП-9 ниже порога чувствительности набора, ММП-2 – 33,46 нг/мл, ФНО-α – 7,1782 пг/мл. При активации клеточной культуры провоспалительным цитокином ИЛ-1β уровень ММП повысился до следующих значений: ММП-9 – 1,6 нг/мл; ММП-2 – 38,78 нг/мл, а уровень ФНО-α оставался прежним. Вероятно, медиаторы воспаления могут увеличивать уровень продукции ММП-9 и ММП-2. При добавлении ОБТП, лизата ОБТП, сыворотки в клеточную культуру эпителия роговицы и в культуру, моделирующую воспалительное окружение, изменений уровней ММП и ФНО-α не зафиксировано. Таким образом, можно заключить, что исследованные стимуляторы (дериваты крови) не являются промоторами продукции ММП-9, -2 типов и ФНО-α клетками эпителия роговицы в нормальных и воспалительных условиях, и могут быть рекомендованы к применению у пациентов после кератопластики.

Результаты исследования кинетики высвобождения ММП- 9, ММП- 2 и ФНО- α в ОБТП.

Кинетику высвобождения ММП-9, ММП-2 и ФНО- α рассматривали исключительно для ОБТП, так как именно данное производное крови содержит в себе не дегранулированные компоненты тромбоцитов и синтетически активные лейкоциты. Исследование кинетики высвобождения показывает, что весь пул ММП высвобождается в течение первых суток. В препаратах, собранных через 48 и 72 часа, наличие ММП-9 не было детектировано, ММП-2 составило 0,08658 нг/мл, причем через 72 часа наличие не выявлено. Что касается ФНО- α , то получен прирост его уровня в ОБТП через 24 часа – 8,95 пг/мл, через 48 часов увеличивается до 10,35 пг/мл, через 72 часа до 17,18 пг/мл. Таким образом, кинетика высвобождения показывает, что ФНО- α синтезируется клеточными компонентами (лейкоцитами), входящими в состав ОБТП в течение как минимум трех суток. Хотя этого количества недостаточно для запуска ответной реакции в культуре, тем не менее не позволяет рекомендовать применение ОБТП после кератопластики.

Результаты клинической части исследования

У всех пациентов до начала лечения диагностирован персистирующий эпителиальный дефект после кератопластики. Пациенты **1 группы** получали стандартную послеоперационную терапию, пациенты **2 группы** на фоне стандартной терапии получали инстилляцию глазных капель аутологичного лизата ОБТП. Осмотр в группах проводили еженедельно до полной эпителизации, далее через 3 мес., 6 мес., 12 мес., 18 мес. *Критерием эффективности лечения считали достижение полной эпителизации.* При отсутствии полной эпителизации в течение 12 недель после операции, или при появлении признаков начального лизиса стромы продолжение консервативного лечения считали нецелесообразным во всех группах. Проводя сравнительный анализ эффективности лечения в группах, следует отметить, что, при отсутствии дополнительной терапии в контрольной **1 группе (n=26)** средний срок полной эпителизации составил **65,9 \pm 16,1** суток – и только у **53,8%** пациентов; у 12 пациентов полная эпителизация не была

достигнута в срок более 12 недель. После завершения эпителизации в 4 случаях наблюдали рецидив ПЭД. У пациентов **2 группы (n=34)**, получающих дополнительную терапию, полная эпителизация достигнута в **73,5%** случаев, в среднем за **39,6±8,7** суток, а минимальный срок лечения глазными каплями лизата ОБТП, после которого достигался эффект, составлял 2 нед. У 9 пациентов эпителизации не удалось добиться и после 12 недель. При этом в 3-х случаях отмена терапии произошла из-за появления признаков начального лизиса трансплантата на фоне лечения. Рецидив ПЭД после полной эпителизации наблюдался в 2-х случаях. Сравнительный анализ среднего срока полной эпителизации выявляет статистически достоверные изменения ($p < 0,05$) между группами. Пациенты **2 группы**, кроме того, отмечали субъективное улучшение состояния на фоне терапии – снижение светобоязни, слезотечения и чувства инородного тела. При биомикроскопии переднего отрезка глаза уменьшалось раздражение, гиперемия пальпебральной и бульбарной конъюнктивы. Послеоперационный отек роговицы разрешался быстрее во 2-ой группе, по сравнению с пациентами, получающие только стандартную терапию.

Анализ связи срока эпителизации с состоянием роговичного трансплантата.

Проведен сравнительный анализ состояния роговичного трансплантата в 2 группах у тех пациентов, у кого полная эпителизация произошла в срок до 12 недель после операции. Выявлено, что в 1 группе после полной эпителизации роговичный трансплантат был непрозрачным (мутным) в 35,7 % (n=5), полупрозрачным в 42,9% (n=6), прозрачным в 14,3% (n=2) случаях. Язва трансплантата, на фоне рецидива ПЭД имела место в одном из наблюдений - 7,1 % (n=1), где пациент в дальнейшем был направлен на повторную кератопластику. Во 2-й группе роговичный трансплантат был непрозрачным (мутным) в 8 % (n=2), полупрозрачным в 32% (n=8), прозрачным в 56% (n=14), язва трансплантата, развившаяся так же на фоне рецидива ПЭД в 4 % (n=1).

Оценка результатов дополнительных методов исследования. Тест Ширмера-1 в динамике продемонстрировал достоверные изменения показателей слезопродукции в исследуемых группах по сравнению с дооперационным уровнем и на фоне проводимого лечения. Анализ теста Ширмера 1 до и после операции в различные сроки показал, что во всех исследуемых группах вне зависимости от предоперационного статуса и вида хирургического лечения отмечается схожая картина изменения слезопродукции на первой неделе. Наиболее существенное повышение слезопродукции по отношению к предоперационному уровню отмечается во всех группах через 1 нед. после операции. При этом существует статистически значимое различие в динамике изменений теста Ширмера 1 ($p = 0,0001$) у пациентов двух групп. В группе с дополнительным лечением значения показателя теста Ширмера-1 уменьшились уже на 4 нед. после операции, тогда как в группе без лечения такая динамика наблюдалась только к 12 нед. Показатели слезопродукции через 12 мес. после операции уже не отличались между группами.

Анализ теста Ширмера-1 может свидетельствовать о том, что на фоне дополнительной терапии отмечается более быстрое снижение слезотечения, спровоцированное хирургической травмой, проявлением послеоперационной воспалительной реакции, наличием швов в конъюнктивальной полости, и неполной эпителизацией роговицы. Это подтверждает предположение, что применяемая методика лечения уменьшает рефлекторное слезотечение и улучшает показатели слезопродукции. Стабилизация дооперационного уровня проходит в более короткий срок, по сравнению с контрольной группой.

Данные *ОСТ* подтверждают сохранение полноценного эпителиального слоя в основной группе в отдаленном периоде наблюдения.

Несмотря на отсутствие полной эпителизации у части пациентов на фоне проводимого лечения, данная методика может считаться эффективной, так как снижается число пациентов, направленных на повторное хирургическое

лечение, и уменьшает риск рецидива эрозии (n=2) у пациентов с полной эпителизацией, в отличие от контрольной группы (n=4). Кроме того, улучшаются сроки восстановления слезопродукции и снижается количество субъективных жалоб.

Таким образом, предложенная методика лечения персистирующего эпителиального дефекта роговицы после различных модификаций кератопластики с применением инстилляций глазных капель аутологичного лизата ОБТП безопасна, эффективна и может быть рекомендована при неэффективности стандартной терапии послеоперационных больных с персистирующим эпителиальным дефектом.

Выводы

1. Впервые в результате экспериментальных (на первичной культуре эпителия роговицы человека и иммортализованной культуре карциномы кожи а431) и клинических (60 наблюдений) исследований доказана эффективность лечения персистирующего эпителиального дефекта после кератопластики препаратом аутокрови – лизатом обогащенной тромбоцитами плазмы.
2. В первичной клеточной культуре эпителия роговицы в условиях, моделирующих воспалительное окружение, и в норме выявлено:
 - а) увеличение уровня матриксных металлопротеиназ 9 и 2 по сравнению с нормой, что свидетельствует о потенциальной роли воспалительного компонента в патогенезе персистирующего эпителиального дефекта.
 - б) отсутствие влияния всех исследованных производных крови на уровень матриксных металлопротеиназ 9, 2 и ФНО- α .
3. На первичной культуре эпителия роговицы человека и иммортализованной культуре карциномы кожи а431 показано, что:
 - а) все исследованные производные крови (сыворотка; обогащенная тромбоцитами плазма; лизат обогащенной тромбоцитами плазмы) стимулируют процессы миграции и пролиферации клеток.
 - б) наиболее выраженным стимулирующим эффектом обладает лизат

обогащенной тромбоцитами плазмы, который в некоторых случаях проявляет антиапоптотическую активность.

4. Сравнительно высокое содержание воспалительного медиатора ФНО- α в обогащенной тромбоцитами плазме, несмотря на отсутствие ответной реакции в культуре, не позволяет рекомендовать этот состав для клинического применения.

5. Доказана клиническая эффективность лизата обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении персистирующего эпителиального дефекта после кератопластики:

а) полная эпителизация в основной группе была достигнута у 73,5% случаев (в контрольной – 53,8%). При этом в основной группе срок полной эпителизации в среднем составил $39,6 \pm 8,7$ суток, а в контрольной $65,86 \pm 16,1$ суток (различие средних в группах достоверно $p < 0,05$).

б) при полной эпителизации в установленные сроки в основной группе роговичный трансплантат был прозрачным и полупрозрачным в 88% случаев, в контрольной группе – в 57,2% случаев.

Практические рекомендации

1. Предложенная методика лечения после различных модификаций кератопластики с применением лизата обогащенной тромбоцитами плазмы является безопасной и клинически эффективной.

2. Оптимальным является применение аутологичных глазных капель лизата обогащенной тромбоцитами плазмы в режиме инстилляций 4-5 раз в день на фоне стандартной медикаментозной терапии, применяемой после кератопластики.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Труфанов С. В., Шахбазян Н. П., Зайцев А. В. Ипсилатеральная автоматизированная передняя послойная ротационная аутокератопластика в лечении поверхностного стромального центрального помутнения // **Вестник офтальмологии.** – 2019. – Т.135, № 5. – С. 209-214.
2. Труфанов С.В., Суббот А.М., Шахбазян Н.П. Биотехнологические методы лечения персистирующих эпителиальных дефектов роговицы // **Вестник офтальмологии.** – 2020. – Т.136, № 5. – С. 277-282.
3. Шахбазян Н.П., Труфанов С.В., Суббот А.М. Влияние 3-х композиций дериватов крови на миграцию и пролиферацию клеток эпителия роговицы в эксперименте *in vitro* (предварительные результаты). Научно-практическая конференция аспирантов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы офтальмологии», Москва – 2020. – С. 30-33.
4. Труфанов С.В., Зайцев А.В., Шахбазян Н.П. Кросслинкинг и фульгурация в лечении акантамебного кератита. **Офтальмология.** 2020;17(4):725-732
5. Суббот А.М., Труфанов С.В., Шахбазян Н.П. Сравнительный анализ регенераторного потенциала производных крови на клеточной модели повреждения эпителия роговицы // **Гены и клетки.** – 2021. – Т. XVI, №1. – С. 64-68.
6. Шахбазян Н.П., Труфанов С.В., Суббот А.М., Применение лизата обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении персистирующих эпителиальных дефектов после кератопластики // **Офтальмологические ведомости.** – 2021; 14 (2):27-35.
7. Труфанов С.В., Шахбазян Н.П., Зайцев А.В., Розинова В.Н. Хирургические методы лечения инфекционных кератитов. **Вестник офтальмологии.** 2021;137(4):128-135.

Основные обозначения и сокращения

- ПЭД – персистирующий эпителиальный дефект
 МКЛ – мягкая контактная линза
 Лизат ОБТП – лизат обогащенной тромбоцитами плазмы
 TGF-β2 – трансформирующий фактор роста β2
 ИЛ-1 – интерлейкин 1
 ОБТП – обогащенная тромбоцитами плазма
 ММП – матриксная металлопротеиназа
 ИФА – иммуноферментный анализ
 ФНО-альфа – фактор некроза опухоли альфа