

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Роль лимбальных стволовых клеток в поддержании анатомической и физиологической целостности роговицы.....	11
1.2. Патогенез и клинические проявления лимбальной недостаточности роговицы.....	16
1.2.1. Патогенез лимбальной недостаточности роговицы.....	16
1.2.2. Иммунные нарушения при лимбальной недостаточности роговицы.....	19
1.3 Патогенетически ориентированное лечение лимбальной недостаточности роговицы	21
1.3.1. Медикаментозное лечение лимбальной недостаточности роговицы	22
1.3.2. Стимулирующий эффект пептидов на регенерацию роговицы.....	22
1.3.3. Стимулирующий эффект препаратов крови на регенерацию роговицы.....	23
1.3.4. Иммунофармакологическое лечение роговичных ран.....	24
1.3.5. Трансплантация амниотической оболочки плода человека в лечении лимбальной недостаточности роговицы.....	25
1.3.6. Трансплантация лимбальных стволовых клеток для лечения лимбальной недостаточности роговицы	27
1.3.7. Ауто- или аллотрансплантация лимбальных стволовых клеток в лечении лимбальной недостаточности роговицы.....	29
1.3.8. Трансплантация стволовых клеток, культивируемых <i>in vitro</i> в лечении лимбальной недостаточности роговицы.....	29

1.3.9. Трансплантация криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека.....	31
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	34
2.1. Характеристика криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека	34
2.2. Морфологические методы оценки криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека	35
2.3. Характеристика экспериментального материала.....	35
2.4. Выполнение экспериментальной модели лимбальной недостаточности роговицы.	36
2.5. Группы животных	37
2.6. Оценка клинических показателей экспериментальных животных.....	37
2.7. Оценка гематологических показателей экспериментальных животных.....	39
2.8. Методы оценки показателей иммунной системы экспериментальных животных.....	40
2.9. Определение цитокинов ИФН- α и ИФН- γ в сыворотке крови, слезной жидкости кроликов с лимбальной недостаточностью роговицы и после лечения.....	40
2.10. Исследование концентрации ростовых факторов.....	41
2.11. Гистологический метод оценки структуры глаза кролика	42
2.12. Макрофотография.....	42
2.13. Статистическая обработка полученных результатов.....	42
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	43
3.1. Отработка экспериментальной модели лимбальной недостаточности роговицы кроликов.....	43
3.2. Отработка метода введения и дозы криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека.....	46

3.3. Влияние криоконсервирования на сохранность криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека.....	49
3.4 Влияние криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека на показатели крови кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточностью роговицы.....	51
3.5. Оценка иммунной системы кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточностью роговицы и после лечения криоконсервированными ядродержащими клетками кордовой крови человека.....	61
3. 6. Исследование ИФН-α и ИФН-γ в слезной жидкости и крови животных.....	69
3.7. Характеристика структуры роговицы интактного кролика при экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы и после лечения.....	77
3.7.1. Особенности структуры роговицы интактного кролика.....	77
3.7.2 Изменения структуры роговицы кролика при лимбальной недостаточности роговицы.....	80
3.7.3. Морфологические особенности роговицы кролика с экспериментальной лимбальной недостаточностью роговицы после введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека.....	85
3.8. Клиническое течение репаративных процессов в глазу экспериментальных животных	94
3.9. Характер накопления ростовых факторов в тканях глаза после введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека.....	101
АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	106
ВЫВОДЫ.....	114
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ABCG2 – АТФ-связывающий белок, подгруппы G2

BDNF – нейротрофический фактор мозга

CD – кластер дифференцировки

DD – домен клеточной смерти

GFRs – рецепторы фактора роста

TAC – транзиторные клетки

TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста β 1

АТ – антитело

ИЛ – интерлейкин

ИФН – интерферон

ИФН- α – интерферон альфа

ИФН- γ – интерферон гамма

кЯКККЧ – криоконсервированные ядродержащие клетки кордовой крови человека

КОЕ – колониеобразующие единицы

ЛНР – лимбальная недостаточность роговицы

ММС – митомицин С

ТА-клетки – амплифицирующие клетки

ТФР – трансформирующий фактор роста

ФНО – фактор некроза опухоли

ФРСТ (CTGF) – фактор роста соединительной ткани

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Потеря зрения по причине поражения роговицы существенно отражается на качестве жизни человека [54]. Доказано, что в патогенезе многих заболеваний органа зрения человека (особенно хронических) особую роль отводят повреждению клеток зоны лимба [53]. Многие работы посвящены изучению механизмов повреждения роговицы глаза при лимбальной недостаточности роговицы (ЛНР). Известно, что из-за воздействия повреждающего фактора происходит первичная деструкция ткани и инициируются патологические физиологические и биохимические процессы в самой роговице (количество лимбальных стволовых клеток (СК)) и ухудшается состояние их микроокружения из-за недостатка специфических ростовых факторов [66, 95, 241, 242].

В настоящее время широко распространены традиционные методы лечения ЛНР: аутоконъюнктивальная пластика, лечебные мягкие контактные линзы, применение стероидов, медицинские препараты, способствующие регенерации эпителия роговицы [67, 68, 85, 96, 148].

При тяжелых формах ЛНР применяют радикальные методы такие, как трансплантация лимбальных ауто- и аллографтов, амниотической оболочки и конъюнктивы [119, 125, 169, 210]. Указанные методы достаточно эффективны, но в большинстве случаев недоступны и требуют от врача определенных навыков и запаса трансплантатов, которые должны храниться в банке [78, 79, 216, 217, 230, 251].

В клинической практике [51, 71, 73], и, в частности, офтальмологии [94, 106], для лечения большинства заболеваний используют клеточную и тканевую терапии [127, 133, 134, 138, 143].

В последнее время в клинической практике все больше применяются ядродержащие клетки кордовой крови человека (ЯКККЧ), которые эффективно используются как источник СК, гемопоэтических и мезенхимальных СК, имеющих сильный клоногенный потенциал, а также в плазме пуповинной крови содержатся многие клеточные биорегуляторы и

ростовые факторы [158, 160, 212, 233, 235]. Исследования гемопоэтического потенциала ЯКККЧ показали, что по количеству и качеству самых ранних стволовых клеток ЯКККЧ не только не уступают костному мозгу взрослого человека, но и по некоторым показателям превышают его [165, 198, 248].

Преимуществом терапии ЯКККЧ, по сравнению с другими методами, является более низкая иммуногенность и доступность. Стволовые клетки ЯКККЧ обладают низкой иммуногенностью, что свидетельствует об отсутствии необходимости в подборе совместимости препаратов [211]. Однако для их хранения необходимы специализированные банки, которые позволяют быстро подобрать материал для трансплантации, доставить сертифицированные пробы в клинику и, соответственно, своевременно оказать помощь пациенту [69].

Таким образом, проблема лечения ЛНР напрямую зависит от поиска новых доступных ресурсов применения клеточной терапии, что позволит восстановить физиологическое течение репаративных процессов и даст значимый клинический эффект. Как известно, для хранения ЯКККЧ в функционально активном состоянии необходимо низкотемпературное консервирование. В связи с этим возможность применения кЯКККЧ для компенсации ЛНР и явилось предметом нашей экспериментальной работы.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа выполнена в рамках тематического плана Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины на тему: «Изучить механизм регенерационных процессов путем исследования структурных и некоторых метаболических показателей организма экспериментальных животных после трансплантации плаценты в условиях атеросклероза» (№ госрегистрации 0106U002170).

Цель исследования. Цель работы – обосновать возможность применения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека для восстановления структурно-функционального статуса и коррекции роговицы в экспериментальной модели ЛНР.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- разработать адекватную экспериментальную модель ЛНР
- оценить особенности влияния криоконсервирования на характеристики клеточных популяций ЯКККЧ, которые потенциально могут обеспечить терапевтический эффект при лечении ЛНР;
- определить дозу и способ введения кЯКККЧ в глаз экспериментального животного с индукцией ЛНР;
- исследовать состояние Т-клеточного иммунитета у кроликов с индукцией ЛНР и после введения кЯКККЧ;
- оценить характер изменений цитокинов ИФН- α и ИФН- γ в слезной жидкости и крови у животных с индукцией ЛНР и после лечения;
- дать сравнительную характеристику патоморфологических изменений в роговице глаза кролика при развитии ЛНР и после введения кЯКККЧ;
- оценить характер накопления ростовых факторов в тканях глаза после введения кЯКККЧ;
- провести исследование клинического течения экспериментальной ЛНР при использовании кЯКККЧ.

Объект исследования – состояние структурно-функциональных характеристик роговицы глаз кролика при экспериментальной ЛНР.

Предмет исследования – криоконсервированные ядросодержащие клетки кордовой крови человека (кЯКККЧ).

Методы исследования: криобиологические, иммунологические, морфологические, биохимические, клинические, статистической обработки данных.

Научная новизна полученных результатов. Впервые экспериментально доказана возможность использования кЯКККЧ для лечения ЛНР. Впервые установлен факт влияния кЯКККЧ на снижение воспалительных процессов, восстановление клинической симптоматики, репарации роговицы при ЛНР. Показано положительное влияние на течение ЛНР не только вводимых клеток кЯКККЧ, но и создаваемого ими

микроокружения. Впервые показано, что введенные внутрироговично кЯКККЧ восстанавливают функциональную и морфологическую структуру роговицы, способствуют более быстрой реабилитации и регрессу воспалительного процесса у животных с экспериментальной ЛНР.

Разработаны доза и метод введения кЯКККЧ для компенсации экспериментальной модели ЛНР у кролика.

Практическое значение полученных результатов.

Экспериментально установленный факт эффективности использования кЯКККЧ для лечения ЛНР является обоснованием возможности ее применения в клинической практике. Из-за низкой иммуногенности и наличия материала в криобиологических банках данный метод позволит своевременно и в полном объеме оказывать необходимую помощь пациентам с ЛНР.

Индивидуальный вклад соискателя. Совместно с руководителем проф., д. м. н. Дёминым Ю. А. был обоснован выбор темы, определены идеология и план выполнения работы. Автором самостоятельно проведен патентно-информационный поиск, анализ литературы, выполнены исследования влияния кЯКККЛ на модификацию состояния ЛНР в эксперименте.

В опубликованных в соавторстве работах личный вклад соискателя состоит:

в работах [1, 5, 8] – в комплексной оценке влияния дозы кЯКККЧ и способа введения ее в глаз экспериментального животного; оценке эффективности компенсации ЛНР при введении кЯКККЧ;

в работах [2, 7] – в разработке экспериментальной модели ЛНР глаза кролика;

в работе [44] – в оценке патоморфологических изменений в ткани глаза кролика при развитии ЛНР и после введения кЯКККЧ;

в работе [4] – в оценке влияния кЯКККЧ на показатели крови у кроликов с экспериментальной ЛНР; проведении исследования Т-клеточного звена иммунной системы у кроликов с экспериментальной ЛНР и после введения кЯКККЛ;

в работе [3] – в исследовании характера изменений ИФН- α и ИФН- γ в слезной жидкости и крови;

в работе [6] – в оценке характера накопления ростовых факторов в тканях глаза животных после введения кЯКККЧ.

Апробация результатов диссертационной работы. Основные положения диссертационной работы представлены и обсуждены на следующих научных форумах: ежегодной конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине» (Харьков, 2011, 2015), научной конференции «Biological and clinical aspects of the use of somatic cells in regenerative medicine» (Вроцлав, Польша).

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 10 научных работ, из которых 7 статей в ведущих профессиональных изданиях, 3 тезиса конференций. Получен патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, разделов «Материалы и методы исследования» и «Результатов исследования и их обсуждения», заключения, списка использованной литературы, включающего 264 источника на 28 страницах. Работа содержит 22 таблицы и 47 рисунков. Общий объем работы составляет 143 страницы, из которых 116 страниц основного текста.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль лимбальных стволовых клеток в поддержании анатомической и физиологической целостности роговицы

Создание концепции лимбальных СК значительно продвинуло исследователей-офтальмологов в понимании процессов пролиферации, миграции и регенерации эпителия роговицы, что внесло непосредственный вклад в совершенствование лечения широкого спектра заболеваний поверхности глаза [73, 98].

Однако, с точки зрения применения лимбальных СК в клинической практике, многие вопросы остаются нерешенными, наиболее важными из которых являются долгосрочное выживание лимбальных аллотрансплантатов и их отторжение, а также улучшение иммуносупрессивных схем лечения [136, 166].

Известно, что поверхность глаза состоит из двух различных типов эпителиальных клеток: конъюнктивы и роговицы [186]. Анатомически они непрерывны, состоят из двух отличающихся друг от друга популяций клеток, а СК роговицы локализованы в лимбе [190]. Микроокружение лимба играет важную роль в поддержании свойств СК, а также является барьером для эпителиальных клеток конъюнктивы, предотвращая их миграцию по поверхности роговицы [192]. Повреждение лимба приводит к разному по степени дефициту лимбальных СК, который имеет характерные клинические признаки, в том числе врастание эпителия конъюнктивы в роговицу [218].

В работах [157, 173] показано, что регенерация роговицы после врастания эпителия конъюнктивы с использованием СК может осуществляться двумя способами: применением лимбального ауто- или аллотрансплантата и индукцией и регенерацией тканей глаза с применением взрослых СК.

Восстановление патологически измененных тканей глаза зависит от популяции СК лимба, которые обладают способностью к самообновлению и

дифференцировке [217]. В настоящее время доказано, что СК глаза взрослого человека в физиологических условиях способны к самоиндуцированию в определенном направлении, в том числе ткани глаза, и, в частности, роговицы [220, 222].

Роговица у человека занимает примерно $1/6$ часть наружной оболочки глаза. Она имеет вид выпукло-вогнутой линзы, а место перехода ее в склеру (лимб) – полупрозрачного кольца шириной до 1 мм [224]. В состав роговицы входят вода, коллаген мезенхимального происхождения, мукополисахариды, белки (альбумин, глобулин), липиды, витамины. Прозрачность роговицы зависит от правильности расположения структурных элементов и одинаковых показателей их преломления, а также содержания в ней воды (в норме до 75%; увеличение воды свыше 86% ведет к помутнению роговицы) [225].

Роговица состоит из 5 слоев. Поверхностный слой (плоский многослойный эпителий) хорошо и быстро регенерирует при повреждениях, выполняет защитную функцию и является регулятором содержания воды в роговице [118]. Боуменова оболочка (рыхло связана с эпителием) бесструктурна, гомогенна, имеет низкий уровень обмена и не способна к регенерации. Это и является причиной того, что при повреждениях остаются помутнения. Строма – самый толстый, прозрачный средний слой, состоящий из тонких соединительнотканых пластинок, содержащих фибриллы коллагена, фибробласты и лимфоидные элементы, которые выполняют защитную функцию [130]. Десцеметова оболочка – это тонкий бесклеточный слой, служащий базальной мембраной эндотелию роговицы. Эндотелий состоит из однослойного плоского или кубического эпителия и защищает строму от непосредственного воздействия водянистой влаги, обладает выраженной барьерной функцией, не регенерирует [131, 149].

К моменту рождения ребенка примерно 20% эпителиальных и стромальных клеток, а также 12% клеток эндотелия активно участвуют в клеточном цикле. К моменту открытия век количество клеток, которые активно пролиферируют в строме и эндотелии, уменьшается почти до нуля.

Такой низкий уровень пролиферации поддерживается на протяжении всей жизни человека. В то же время заметно возрастает уровень пролиферации в клетках эпителия роговицы, что составляет 75% [92, 185].

Подтверждение о расположении эпителиальных СК роговицы в лимбальной области было основано на клинических и лабораторных исследованиях, которые явно идентифицируют базальный слой лимбального эпителия как источник СК [98].

С помощью иммуногистохимических методов исследования было подтверждено, что базальный слой эпителия лимба имеет самый низкий уровень дифференцировки среди всех эпителиальных клеток роговицы. Это доказывается тем, что в эпителии конъюнктивы роговицы содержится небольшое количество кератинов, которые представляют собой группу нерастворимых в воде белков цитоскелета и образуют связанные с десмосомами (10 нм) промежуточные филаменты практически во всех видах эпителия [73, 152, 177].

Доказана высокая способность к пролиферации базального слоя лимба в клеточных культурах [74, 104]. В случае частичного или полного удаления эпителия лимба, в роговице появляются аномалии ее поверхности, которые характеризуются врастанием конъюнктивы эпителия, васкуляризацией и хроническим воспалением, что, в свою очередь, может быть объяснено дефицитом лимбальных СК [113]. Еще одним доказательством наличия СК в зоне лимба является относительно высокое преобладание различных новообразований в этом участке роговицы [116, 261].

Результаты математического анализа кинетики поддержания эпителиальной массы роговицы подтвердили экспериментальные исследования о том, что эпителий роговицы может поддерживаться путем центростремительной миграции эпителиальных клеток лимба без влияния на соседнюю конъюнктиву [110, 115].

Приведенные выше источники указывают на то, что в области базального слоя (шириной 1,5–2 мм) и эпителия лимба находятся СК

эпителия роговицы. Это небольшая субпопуляция клеток, которая составляет 0,5...10% от общего количества клеток, расположенных в палисадах Вогта [114].

На данный момент отсутствует четкое понимание того, что именно поддерживает свойства СК: сами СК и/или их микроокружение [128]. Несмотря на то, что в базальном слое эпителия роговицы находится небольшое количество СК, они обладают высокой способностью к самообновлению и большим пролиферативным потенциалом [139]. В здоровых тканях роговицы СК имеют тенденцию оставаться в спокойном состоянии, однако при стимуляции или патологии они делятся и подвергаются дифференцировке с образованием транзиторных клеток (ТАС – transit amplifying cells) [140].

Наиболее вероятно, что базальный слой эпителия лимба состоит не только из СК, но и ТАС, которые расположены в нем и среди периферического эпителия роговицы. Наряду со стволовыми клетками ТАС играют важную роль в регенерации тканей глаза при заживлении [146]. При этом в лимбе и периферической роговице ТАС проявляют некоторые характерные для СК свойства: долгую продолжительность существования и медленный клеточный цикл с низкой митотической активностью и дифференцировкой в нормальном состоянии. В центральном отделе роговицы ТАС, напротив, относятся к короткоживущим клеткам с быстрым циклом клеточного деления, что дает им возможность эффективно наращивать клеточную массу путем ограничения количества митозов. В критическом состоянии ТАС могут останавливать митоз и дифференцироваться в супрабазальные постмитотические клетки роговицы, то есть в дифференцированные клетки [146, 162].

Точный механизм деления ТАС, хотя и остается неизвестным, но во многих исследованиях было показано [175], что контроль за кинетикой митоза в лимбальных СК отличается от такового для клеток роговицы. Наличие ТАС в лимбе и роговице обеспечивает, с одной стороны, усиление каждого деления

СК и сведение к минимуму необходимости их пролиферации с сохранением энергетических ресурсов. С другой стороны, их присутствие минимизирует возможность появления ошибок в репликации ДНК в популяции СК, а также способствует появлению новых клеток, находящихся гораздо ближе к окончательно дифференцированному функциональному клеточному компартменту, например эпителию, который покрывает центральную роговицу [146, 176].

Доказано [189], что на миграцию лимбальных СК влияют многие регуляторные факторы, как во время развития плода, так и в период жизни человека и животного. В работах [189, 204] было показано, что в клеточных мембранах базального слоя лимбального эпителия находятся рецепторы к различным факторам роста. Показано [262], что у крыс, например, недифференцированные клетки в базальном слое лимбального эпителия содержат более высокие уровни рецепторов фактора роста (GFRs - Growth factor receptors), чем в супрабазальном. Несмотря на то, что высокая экспрессия GFRs в клетках базального слоя лимбального эпителия также подтверждалась и на человеческой роговице, нет четкой разницы в интенсивности окрашивания между базальными клетками лимба, роговицы и конъюнктивы.

В работах [224, 226, 258] было предположено, что высокий уровень содержания GFRs на клетках базального слоя лимба может ингибировать их дифференцировку посредством сигнализирования клетке о поддержании их пролиферативного потенциала.

Одним из защитных механизмов патологической дифференцировки клеток является относительное состояние покоя СК во время устойчивого роста. В этот период СК прекращают активно синтезировать ДНК, усиливают рост популяции амплифицирующих клеток (ТА-клеток). Более дифференцированным потомством СК являются ТА-клетки: они имеют менее длительный жизненный цикл, обладают меньшим пролиферативным потенциалом, лишены способности регулировать процессы восполнения и

замещения утраченных клеток. Если СК роговицы находятся только в базальном слое лимба, то ТА-клетки располагаются по всей поверхности роговицы, в ее базальном слое. Клетки базального слоя лимба делятся путем асимметричного митоза и центростремительного движения СК [189, 190, 192]. Как только СК мигрируют из лимбального слоя в центр роговицы, они начинают дифференцироваться в зрелые эпителиальные клетки [207].

Длительный клеточный цикл и низкая митотическая активность являются одними из главных характеристик СК, хотя при определенных условиях они могут обладать высокой митотической активностью [97, 259].

1.2. Патогенез и клинические проявления лимбальной недостаточности роговицы

1.2.1. Патогенез лимбальной недостаточности роговицы. В настоящее время доказано, что важную роль в поддержании гомеостаза в организме человека и животных играет процесс сбалансированного роста и гибели клеток [108, 152], т.е. процесс дифференцировки всех клеток в организме связан с апоптозом. Существуют два основных пути апоптоза клетки: митохондриальный и через рецепторы. К рецепторам апоптоза относится семейство белков Аро-1 или Fas (CD95) и фактор некроза опухоли (ФНО) [115, 222]. Фактор некроза опухоли является высокоцитотоксичным веществом и используется для противораковой терапии. Представители этого семейства (не все) имеют домен клеточной смерти (death domain – DD) – домен белок-белкового взаимодействия, связывающийся с белком-адаптором, таким как FADD (associated death domain). Активация рецепторов апоптоза лигандами (например, CD-95L и ФНО) приводит к активации каспазы-8, запуская каскад реакций, приводящих клетку в состояние апоптоза [146, 168].

Митохондриальный путь выполняет центральную роль в апоптозе, при этом наблюдается увеличение проницаемости митохондриальной мембраны. Баланс между про- и антиапоптозными членами семейства Bcl-2 (apoptosis

regulator Bcl-2) регулирует выход проапоптотических веществ из митохондрий, ведущих к запуску апоптоза, таких как AIF, эндонуклеаза G, Smac/DIABLO и цитохром C. Утечка цитохрома C из митохондрии приводит к образованию апоптосомы в цитоплазме, которая активирует каспазу-9 и запускает клеточную смерть [168].

Лимбальные СК тесно связаны с сосудами и, в отличие от центральной зоны, постоянно контактируют с факторами выживания. В работах [103, 246] отмечено, что фибробласты лимба (в отличие от других клеток роговицы) содержат особый белок и выделяют антиапоптотические факторы. Таким образом, антиапоптотические факторы выполняют регуляторную роль и определяют сроки жизнедеятельности лимбальных СК, их функционирование также способствует дифференцировке в ТА-клетки.

Важную роль в поддержании жизнедеятельности лимбальных СК играют цитокины [107, 112, 137]. В работе [237] была предложена гипотеза обновления клеток роговицы: потеря поверхностных эпителиальных клеток равна сумме пролиферации базальных клеток, пролиферации и центрипетальной миграции лимбальных клеток. По данным этих авторов поврежденный эпителий роговицы восстанавливается за счет эпителиальных клеток, которые происходят из лимбальных СК и мигрируют на ее поверхность. Возможной причиной ЛНР может быть дефицит стромального микроокружения, поддерживающего СК, вследствие которого развиваются такие заболевания: аниридия; врожденная эритрокератодермия; кератит, связанный с различными эндокринными нарушениями; нейротрофическая кератопатия и хронический лимбит. Кроме того, причиной развития ЛНР может быть и внешнее влияние (химические или термические поражения, синдром Стивенса-Джонсона, глазной рубцовый пемфигOID, многочисленные операции или криотерапия, ношение контактных линз и тяжелые микробные инфекции), которое разрушает лимбальные СК [73, 111, 218, 252, 253].

Лимбальная недостаточность роговицы может быть как диффузной (общей), так и секторальной (частичной). В последнем случае врастание

эпителия конъюнктивы роговицы ограничивается областями ее недостаточности. У некоторых пациентов дефицит лимбальных клеток может быть бессимптомным. С течением времени он может прогрессировать до явного дефицита в результате истощения популяции СК [11, 88].

По клиническим проявлениям ЛНР характеризуется следующими признаками: конъюнктивальный паннус, хроническое воспаление, помутнение роговицы различной степени выраженности, неоваскуляризация, недостаточно хорошее взаимодействие эпителиальных клеток, что, в свою очередь, проявляется неровностью поверхности роговицы, деструкцией ее базальной мембраны, рецидивирующими эрозиями и язвами [118, 124].

Некоторые заболевания (аниридия, кератит) связаны с эндокринными нарушениями. Нейротрофическая кератопатия и птеригиум/псевдоптеригиум представляют собой легкую форму дефицита лимбальных СК. При этом происходит постепенная потеря или слабая генерация СК. Такие пациенты могут испытывать серьезную светобоязнь, боль, снижение зрения и даже слепоту [136, 146, 161].

Заболевания, которые приводят к развитию ЛНР, связаны с: повреждением популяции лимбальных СК, вызванной химическими и термическими факторами; сочетанными хирургическими вмешательствами, криотерапией лимба; синдромом Стивенса-Джонсона, токсическим эпидермальным некролизом; кератопатией, индуцированной ношением контактных линз; острыми микробными инфекциями с вовлечением лимба; радиацией. Также этиологическим фактором является дисфункция стромы лимба, связанная с применением антиметаболитов (например, митомицин-С) [121, 129]; аниридией (наследственное заболевание); кератитами, ассоциированными с полиэндокринной недостаточностью (наследственное заболевание); нейротрофическими кератопатиями; хронической буллезной кератопатией; хроническим воспалением зоны лимба, периферическим воспалением лимба или язвой; птеригиумом, псевдоптеригиумом; идиопатической кератопатией [168, 173, 174, 180].

Общим патогенетическим фактором данных заболеваний является истощение популяции лимбальных СК, благодаря чему и происходит врастание эпителия конъюнктивы или конъюнктивальных элементов на поверхности роговицы [182, 183]. Такие пациенты являются плохими кандидатами для обычных трансплантаций роговицы по нескольким причинам. Во-первых, с помощью этой процедуры пересаживают только ПКП роговицы, а не лимбальные СК. Во-вторых, воспаление и существующая ранее васкуляризация роговицы увеличивают риск отторжения аллотрансплантата. В-третьих, в таких случаях, как правило, развивается рецидив врастания эпителия конъюнктивы из-за дисфункции лимбальных СК [82, 109, 206, 208].

1.2.2. Иммунные нарушения при лимбальной недостаточности роговицы. Иммунные нарушения могут быть как предпосылкой, так и следствием развития ЛНР [21]. При этом наблюдаются стимуляция местной и/или системной продукции и нарушение баланса про- и противовоспалительных цитокинов, дефекты в системе интерферонов (дефицит или, наоборот, гиперпродукция ИФН- α и/или ИФН- γ), ослабление Т-клеточного иммунитета, особенно его хелперного звена, дисиммуноглобулинемия (в сыворотке и слезной жидкости), повышение концентрации циркулирующих иммунных комплексов и т. д. Успехи в изучении цитокинов позволили расшифровать основные звенья патогенеза ЛНР, остававшиеся долгое время неясным. Главными медиаторами воспаления, по мнению большинства исследователей, являются ФНО- α и ИЛ-1 ρ [28]. Во время опытов на животных установлено, что внутриглазные инъекции этих цитокинов индуцируют воспалительный процесс, а последующее введение антител к ФНО или антагониста рецептора ИЛ-1В супрессирует воспаление. Экспериментально установлен также эффект ИЛ-8, цитокина, обладающего выраженной хемотаксической активностью для лейкоцитов и посредством этого участвующего в развитии воспаления. Другие цитокины (ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-4, ИФН- α , ИФН- γ) проявляют

неоднозначный, дозозависимый эффект, в разных условиях усиливая или, наоборот, супрессируя внутриглазное воспаление [38, 61, 239]. Показано, например, что первичное введение ИЛ-6 в стекловидное тело индуцирует развитие увеитов у крыс, однако при повторных инъекциях, наоборот, формируется резистентность к заболеванию. Объяснением этого могут служить особые свойства ИЛ-6: являясь типичным цитокином воспаления, он ограничивает выработку других провоспалительных цитокинов, что определяет его двойственную патогенетическую роль. Характерно, что у больных инсулинзависимым сахарным диабетом нарушения цитокинового статуса, как системные (очевидно, связанные с развитием основного заболевания), так и местные (в глазу), наблюдаются задолго до появления клинических признаков ЛНР. Особое внимание привлекает ФНО- α [65, 77, 194].

Практически на всех стадиях заболевания, начиная с субклинической и вплоть до терминальной, наблюдается гиперсекреция этого цитокина в слезной и внутриглазных жидкостях. Для больных с диабетической ретинопатией характерно также выраженное усиление системной продукции ФНО- α , что в литературе рассматривают как один из ключевых факторов общего патогенеза инсулинзависимого диабета. Полипотентность функций ФНО- α , в частности, такие важные в плане рассматриваемой проблемы эффекты, как активация эндотелия сосудов и стимуляция ангиогенеза, а также Т- и В-лимфоцитов и аутоиммунных реакций и цитотоксическое действие непосредственно на клетки-мишени дают основание считать стойкое повышение его продукции неблагоприятным фактором, способствующим развитию и прогрессированию ЛНР [81, 87, 104, 172]. Увеличение выраженности сдвигов в цитокиновом статусе ассоциируется с переходом в терминальную, пролиферативную стадию диабетической ретинопатии. Определены ключевые, прогностические маркеры этого периода: в слезной жидкости – значительный подъем уровня ИФН- γ (до 25 000–30 000 пкг/мл при норме 8 000–10 000 пкг/мл), с гиперпродукцией которого связано

нежелательное усиление иммунопатологических реакций; в сыворотке – избыток одного из основных регуляторов пролиферативных процессов – ТФР- α (40 000–60 000 пкг/мл при норме 20 000–30 000 пкг/мл). Существенный вклад в развитие и прогрессирование ЛНР вносят аутоиммунные реакции, индуцированные антигеном сетчатки. Лимбальная недостаточность роговицы ассоциируется с накоплением антител во внутриглазных жидкостях и в сыворотке или их исчезновении, обусловленном формированием циркулирующих иммунных комплексов малых размеров [142, 150, 151, 167].

1.3. Патогенетически ориентированное лечение лимбальной недостаточности роговицы

Основная цель проводимого лечения заключается в стимулировании процессов заживления поврежденных тканей глаза, сокращении сроков купирования воспалительной реакции, сохранении функциональной способности органа зрения и уменьшения количества инвалидизирующих исходов [209].

Например, ЛНР при ожоговой травме глаза относится к числу наиболее тяжелых видов повреждения, поскольку в зависимости от тяжести альтерации она сопровождается мгновенной деструкцией архитектоники защитного аппарата, фиброзной оболочки и сосудистой сети переднего отдела органа зрения [35]. В результате обширных нарушений морфофункциональных структур происходит срыв метаболических процессов, инициирующих повышение сенсibilизации к аутоантигенам высокоспециализированных тканей глаза. Объем проводимых лечебных мероприятий зависит от степени тяжести патологии [61, 62]. На фоне восстановления гемомикроциркуляции, первоначально на клеточном и внутриклеточном уровнях, развиваются пролиферативные процессы, обеспечивающие регенерацию коллагеновых волокон и промежуточного вещества стромы роговицы. Поскольку в процессе регенерации участки некроза ткани заполняются не специфической тканью, а

соединительной с формированием рубца, то речь идет о субституции с наличием компенсаторной гипертрофии [11, 19, 64, 124].

1.3.1. Медикаментозное лечение лимбальной недостаточности роговицы. Для закрытия дефекта эпителия роговицы используется широкий перечень лекарственных средств: «Метилурацил», «Солкосерил», витамин А, «Цистеин», витамин Е [6, 20], аналог витамина А, лекарственные композиции на основе коллагена [10], гликозаминогликаны [34], «Бетамецилл», «Метамецин» [26], «Реаферон», «Эмоксипин», «Липнохромин», «Адгелон», «Энкад» и «Витасик» [15, 37, 55], прополис, экстракт из пантов северного оленя – ретиноидов [39], «Ранторин» – представитель группы адаптогенов [24], глазной гель «Солкосерил» [41, 43, 59, 120].

В работе [58] выявлен положительный эффект применения глазных пленок с альгинатом натрия при язвенных поражениях роговицы. Отмечено ускорение эпителизации, очищение раны, что, по мнению авторов, создает благоприятные условия для ее заживления.

Для ускорения регенерации применяется витамин Е, известный как антиоксидант, связывающий свободные радикалы и стабилизирующий лизосомальные мембраны. При инкубации кератоцитов кролика с витамином Е отмечено ингибирование продукции коллагена, а также усиление гуморального и клеточного иммунитета под влиянием витамина Е [6, 11].

1.3.2. Стимулирующий эффект пептидов на регенерацию роговицы. Выявлено стимулирующее влияние на процесс регенерации эпителия роговицы у крыс пептидов, полученных из различных тканей глаза у человека и быка с м. м. от 1050 до 1500 Дальтон. При этом отмечено увеличение митотической активности клеток эпителия роговицы крыс. Показано отсутствие видовой и наличие тканевой специфичности у тканевых пептидов [44]. Из роговицы глаз, полученной у сельскохозяйственных животных, были разработаны глазные капли «Азидарег» (Уфимский НИИ ГБ, Россия). [3], которые в 1%-й концентрации

ускоряют процессы регенерации, стимулируют пролиферацию кератобластов, формирование коллагеновых структур и синтез кератогликозаминогликанов.

1.3.3. Стимулирующий эффект препаратов крови на регенерацию роговицы. В клинической практике на протяжении многих лет широко используется антитоксическое и иммуннокорректирующее действие препаратов крови: сыворотка, аутоплазма, фильтрат крови, белковые кровезаменители, гамма- глобулины, антистафилококковая сыворотка [75].

В работе [19] предложено в качестве адсорбирующего вещества наносить на пораженную роговицу глаза лиофилизированную плазму крови, растворенную в физиологическом растворе. Несмотря на это [197, 199], считается, что данный метод лечения не совсем корректный, поскольку связан с явлениями аутосенсibilизации организма и наличием токсических веществ в аутокрови. Тем не менее фармацевтическая индустрия внедрила в практику лечения глазных болезней капли, в основу которых входит аутологичная сыворотка. Такое лекарственное средство обеспечивает роговице глаза пациента дополнительные питательные вещества, которые обладают эпителиотропными свойствами. Практически никакими побочными эффектами такие капли не обладают, они положительно влияют на восстановление патологически измененного эпителия роговицы, жизнеспособность клеток в нем, а также на клинический процесс реэпителизации [223]. Однако, отсутствие рандомизированных контролируемых испытаний, а также логистические трудности (высокая стоимость производства, хранение в низкотемпературном банке, риск инфекции, биологическая изменчивость составляющих) до сих пор препятствуют широкому использованию таких глазных капель на основе сыворотки аутокрови [75].

Использование контактных линз является дополнительной мерой для поддержания процесса заживления эпителия роговицы. Тем не менее, гипоксия ткани, вызываемая длительным ношением контактных линз и низким содержанием воды в гидрогелевых линзах с пониженной

проницаемостью кислорода, может способствовать неоваскуляризации и инфекции [140, 159].

Применение склеральных контактных линз, в некоторых случаях, может быть более адекватным методом лечения. Прекорнеальное пространство заполнено кислородом и слезной жидкостью, что помогает поддерживать регенерацию эпителия. Эта полость также частично удерживает активные ингредиенты, которые попадают вместе с глазными каплями. Однако к недостаткам применения таких линз относится их высокая стоимость и трудоемкость в изготовлении [191, 205].

Ускорению эпителизации роговичной раны и восстановлению ее основных свойств способствует использование коллагеновых покрытий [196], фетальных клеток роговицы [91].

1.3.4. Иммунофармакологическое лечение роговичных ран. В последние годы в связи с достижениями иммунофармакологии появились сообщения об использовании препаратов, содержащих цитокины. Цитокины оказывают действие максимально приближенное к физиологическому. Они относятся к иммунопептидам и вырабатываются клетками лимфоидной и нелимфоидной природы [112].

На основании проведенных экспериментальных и клинических исследований было показано, что цитокины оказывают противовоспалительное и ранозаживляющее действие [1, 2]. На основании полученных результатов было предположено, что влияние комплекса цитокинов на репаративные процессы обусловлено торможением воспалительной реакции за счет угнетения миграции клеток (принимающих в них участие) из зоны лимба к очагу повреждения, а также изменением пролиферативной активности фибробластов и кератоцитов [9].

Большое внимание при изучении репаративных процессов уделяется и различным факторам роста – эпидермальному, выделенному из тромбоцитов, вещества мозга и эндотелия сосудов [27]. Фактор роста фибробластов, полученный из мозга быка, при введении в переднюю камеру глаза оказывал

стимулирующий эффект на пролиферацию эндотелия роговицы у в экспериментальной модели [200].

Многие регуляторные пептиды, обладающие свойствами улучшения трофики и активации роста, влияющие на местный иммунитет и состояние макромолекул, обнаружены в тканях глаза. Так, в роговице выявлен мет-энкефалин, эндорфин, фактор роста фибробластов и др. [254]. Однако, несмотря на наличие терапевтических средств для лечения ЛНР, их эффективность зачастую оказывается недостаточной, и возникает необходимость в применении трансплантации [25, 49].

1.3.5. Трансплантация амниотической оболочки плода человека в лечении лимбальной недостаточности роговицы. В тех случаях, когда эпителиальный дефект невозможно вылечить консервативным методом, применяется трансплантация амниотической оболочки [4, 5].

Амнион или амниотическая оболочка представляет собой внутренний слой плаценты толщиной от 0,02 до 0,5 мм. Обычно амниотическая оболочка состоит из трех слоев: эпителиальный монослой, толстый базальный слой и лишенный сосудов гипоцеллюлярный стромальный матрикс. Структурная целостность, прозрачность и эластичность основы амниотической оболочки позволяет наиболее широко применять ее для замены тканей при реконструкции поверхности глаза [78].

Как известно, амниотическая оболочка плода обладает функцией миграции, адгезии и дифференцировки эпителиальных клеток [99]. Это идеальный субстрат для поддержания роста эпителиальных клеток-предшественников, который способствует продлению срока жизнедеятельности, поддержания клоногенности и предотвращает апоптоз эпителиальных клеток [102].

В работе [219] впервые применили трансплантацию амниотической оболочки для реконструкции поверхности роговицы в модели общего лимбального дефицита у кролика. Они использовали такую технологию в

сочетании с лимбальной аллотрансплантацией и получили эффективную реконструкцию поверхности роговицы у пациентов с тяжелой патологией «сухого» глаза. Для восстановления поверхности роговицы достаточно трансплантации амниотической оболочки глаза с частичной ЛНР [230], поскольку она может способствовать стимуляции и миграции сохранившихся эпителиальных лимбальных СК пациента [234].

Амниотическая оболочка содержит большое количество ростовых факторов, которые потенциально вовлечены в эпителиально-стромальные взаимодействия поверхности глаза человека, а именно эпителизацию, модуляцию пролиферацию и дифференцировку стромальных фибробластов. Кроме того, эпителий амниотической оболочки является источником цитокинов, которые играют решающую роль в микроокружении лимбальных СК. Базальный слой амниотической оболочки содержит коллаген IV, V, VII типов, Ln1, LN5 и фибронектин, которые важны для адгезии и миграции эпителия клеток роговицы [264]. Стромальный матрикс амниотической оболочки, в свою очередь, подавляет экспрессию определенных воспалительных цитокинов поверхностного эпителия глаза, включая ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-8, ИНФ- γ , ФНО- β , и основной фактор роста фибробластов и тромбоцитов [79]. Амниотическая оболочка обладает способностью привлекать и изолировать клетки, которые проникают при воспалительном процессе поверхности глаза, а также содержат различные формы ингибиторов протеазы, что объясняет некоторые ее противовоспалительные свойства. Строма амниотической оболочки содержит большое количество различных факторов роста [126], которые играют важную роль в сохранении эпителия и трансплантата СК. Роговицу глаза кролика после эксимерной лазерной абляции покрывали слоем амниотической оболочки и отмечали заметное снижение острой воспалительной реакции, о чем свидетельствовал апоптоз полиморфоядерных нейтрофилов [126].

При моделировании щелочных ожогов роговицы у кроликов и трансплантации амниотической оболочки, используемой в качестве

временной накладке, было показано, что она способствует снижению развития острого и тяжелого воспалительного процесса, обеспечивая меньшее проникновение полиморфоядерных нейтрофилов. Такое противовоспалительное действие амниотической оболочки объясняется созданием с ее помощью невоспаленной стромы, что является необходимым условием для успешной трансплантации лимбальных СК и их выживания [125, 153].

Несмотря на то, что трансплантация амниотической оболочки не влечет за собой серьезных осложнений, после операции могут происходить изменения в органе зрения. Так, в раннем послеоперационном периоде под амниотической мембраной может образовываться гематома. Кровь из гематомы обычно поглощается макрофагами, однако при обильном кровотечении может потребоваться дренаж, который осуществляется путем небольшого надреза в области трансплантата. Иногда сохраняется остаточная субэпителиальная мембрана и помутнение оболочки глаза. При трансплантации амниотической оболочки микробные инфекции составляют всего 1,6% [159]. Наличие грамположительных микроорганизмов является наиболее частой причиной отторжения трансплантата амниотической оболочки [170].

В работах [179, 188, 214] описан стерильный гипопион после повторной трансплантации амниотической оболочки. Кальцификация встречается примерно в 12,8% случаях, что может быть причиной оседания белых бляшек ципрофлоксацина на роговице. Однако тщательный подбор донора и реципиентов, а также поддержание высоких стандартов качества при подготовке трансплантата АМ и проведения процедуры позволяют снизить послеоперационные осложнения.

1.3.6. Трансплантация лимбальных стволовых клеток для лечения лимбальной недостаточности роговицы. Трансплантация лимбальных СК является одним из возможных способов лечения ЛНР [220]. Успех этой процедуры зависит от множества

факторов и может негативно сказываться на сопутствующих патологиях века, сухости глаза и неконтролируемых системных заболеваниях [236, 245].

Лимбальные СК собирают на носитель, который может быть конъюнктивой (конъюнктиво-лимбальные трансплантаты) или роговицей (роговично-лимбальные трансплантаты) [74].

Такие трансплантаты получают с помощью различных методов из слоя эпителиальных клеток роговицы, а также клеток, культивированных на полимерной подложке, коллагене, фибрине [105] или на других видах биоматериала, например, амниотической мембране плода [125]. Альтернативные источники клеток со свойствами СК широко исследуются различными авторами [154].

В работах [181, 255] пациентам с ЛНР трансплантировали культивированный участок слизистой оболочки с использованием амниотической оболочки в качестве субстрата, при этом улучшилось зрение и стабилизировался поверхностный слой слизистой глаза.

В работах [73, 74, 227] применяли эмбриональные стволовые клетки, которые в условиях культивирования дифференцировались в эпителиально-подобные клетки. Однако использование данного метода лечения ЛНР связано как с техническими, так и этическими проблемами. Кроме того, должны быть проведены экспериментальные и дополнительные клинические исследования указанного метода лечения ЛНР, которые позволили бы решить вопрос о его безопасности для пациента.

Альтернативным источником получения эпителиальных клеток для лечения ЛНР могут быть СК из волосяного фолликула и эпителиальные клетки из слизистой [111, 227].

В последнее время клетки плацентарного комплекса и костного мозга были предложены в качестве клеточной терапии заболеваний поверхности глаза [97, 135, 154].

Трансплантация фетальных клеток, культуры эпителия стромальных и эндотелиальных клеток на роговицу с помощью контактной линзы,

инсталляции их или инъекции под конъюнктиву у больных с эрозиями роговицы, ожогами конъюнктивы с некрозом, язвами роговицы различного генеза, эпителиально-эндотелиальной дистрофией роговицы, способствовала ускорению эпителизации роговичного дефекта, восстановлению кровотока конъюнктивы, уменьшению отека роговицы [84, 244, 250].

1.3.7. Ауто- или аллотрансплантация лимбальных стволовых клеток в лечении лимбальной недостаточности роговицы. В настоящее время известно, что при ЛНР необходимо проводить трансплантацию ауто- или аллогенных лимбальных СК [238]. Для этого донорская ткань может быть взята из парного здорового глаза (конъюнктивально-лимбальный аутооттрансплантат), у здорового донора-родственника (конъюнктивально-лимбальный аллотрансплантат) или из глаза трупа-донора (кератолимбальный аллотрансплантат) [169].

Трансплантация лимбальных СК включает в себя пересадку больших участков от донорского лимба. Однако каждая из разновидностей данного метода имеет и свои недостатки. Так, в случае аллотрансплантации от донора-родственника существуют ограничения, связанные с количеством лимбальной ткани, которую можно взять без риска появления ятрогенной ЛНР в глазу донора [136]. Кроме того, после аллотрансплантации лимбальных СК от здорового донора-родственника или трупа может быть отторжение. Успех данной процедуры зависит от степени агрессивности системной иммуносупрессии [221, 238], что связано с высокой заболеваемостью и снижением качества жизни.

1.3.8. Трансплантация стволовых клеток, культивируемых *in vitro*, в лечении лимбальной недостаточности роговицы. В последнее время, благодаря полученным знаниям в области биологии лимбальных СК, был разработан способ их культивирования для последующей трансплантации из биопсийного материала. Такой метод позволил клиницистам преодолеть некоторые из основных препятствий, возникающих при пересадке цельной

ткани лимба [63, 231]. Однако важным является то, что лимбальные СК можно культивировать, используя небольшое количество ткани, и тем самым минимизировать повреждение глаза донора и истощение запаса СК. Данный метод позволяет пересаживать только эпителиальные клетки, а не клетки Лангерганса и кровеносные сосуды, поэтому теоретически снижается вероятность их отторжения [74, 89, 90, 108]

Существует три основных метода культивирования лимбального эпителия: культивирование лимбального эпителия с митотически инактивированными мышинными фибробластами [130], использование амниотической оболочки человека в качестве субстрата для выращивания эпителия и сочетание двух указанных методов [170].

В качестве подложки для культивирования лимбальных СК используют фибрин [159]. Из-за этических причин, связанных с амниотической мембран, недостаточно хорошей гистосовместимостью, риском возникновения инфекционных осложнений и техникой самой трансплантации исследовательские работы были направлены на изготовление альтернативы амниотической мембране для культивирования лимбальных СК. Это должен быть прозрачный, достаточно прочный, чтобы выдержать все манипуляции, и экономически доступный гистосовместимый биоматериал [164, 238].

Для культивирования лимбальных СК использовали биологические или синтетические полимеры [146, 245]. Была выбрана подложка из коллагена, которая наиболее подходит для замены амниотической оболочки: она простая в изготовлении, недорогая, биосовместима, обладает хорошими оптическими свойствами и содержит фибробласты. Лимбальные СК культивируются на такой подложке и их фенотип подобен фенотипу клеток роговицы центральной зоны [238].

1.3.9. Трансплантация криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови человека.

Исследования лимбальных СК в области офтальмологии за последние два десятилетия намного продвинулись вперед. Лимбальные СК функционально определяются как клетки, которые способны к самообновлению и организации постоянной популяции идентичных дочерних клеток с тем же неограниченным потенциалом к пролиферации и образованию любой ткани организма [118, 156].

С момента открытия того, что эпителиальные СК расположены в роговице, лечение офтальмологических заболеваний вышло на более высокий уровень: появились новые перспективные диагностические и терапевтические методы [184].

Потенциальная клиническая польза СК заключается в возможности заменять поврежденные клетки здоровыми, которые образовались из них или появились вследствие их паракринного эффекта и способны поддерживать микросреду ткани или привлекать эндогенные факторы циркулирующих клеток-предшественников, чтобы восстанавливать поврежденные клетки глаза [47, 195, 207].

Впервые трансплантацию кЯКККЧ провели в 1988 г. пациенту с анемией Фанкони [213]. В дальнейшем (1993–2007 гг.), согласно разным данным, было выполнено 8 000–9 000 процедур введения кЯКККЧ пациентам с различными заболеваниями [122, 247, 249]. Япония является лидером по количеству ежегодного лечения больных введением кЯКККЧ, на втором месте США (50% трансплантаций у детей и 20% – у взрослых пациентов) [93]. Для сертификации и длительного хранения кЯКККЧ были созданы низкотемпературные банки, в настоящее время их количество составляет 350–400 тысяч во всем мире [101, 104, 201].

Обоснованием для применения кЯКККЧ в клинической практике для лечения широкого спектра заболеваний является содержание в них

гемопозитических СК, клеток-предшественников, мезенхимальных СК, а также различных биологически активных веществ [93, 215, 240].

СК являются плюрипотентными, то есть низкодифференцированными и менее иммунореактивными по сравнению со специализированными клетками взрослого организма, и обладают такими свойствами как пластичность, могут трансформироваться не только в гемопозитические, но и в высокодифференцированные органоспецифические клетки [147, 193, 259].

К преимуществам кЯКККЧ, по сравнению с клетками костного мозга и периферической крови, относят доступность и относительно низкий уровень реакции трансплантат против хозяина [93, 100].

В настоящее время показано, что в суспензии кЯКККЧ определяются клетки с $CD34^+$, $CD38^-CD90^+$, $CD45^+$, а также зрелые клеточные формы [123, 132, 141, 187].

До настоящего времени неизвестно как наиболее эффективно управлять внутриклеточными сигнальными молекулами для повышения спектра действия, самонаведения и приживания, однако такие знания позволят раскрыть механизмы действия гемопозитических СК в условиях патологически измененного организма [70, 229, 240]. Микроокружение, как известно, так же играет большую роль в жизнедеятельности кЯКККЧ: оно состоит из взаимодействующих сетей стромальных клеток, мезенхимальных и эндотелиальных СК, эндотелиальных клеток-предшественников фибробластов и дифференцированных клеток периферической крови [86, 107, 117, 155].

Хемокин-хемокиновые рецепторы, которые находятся в стромальных клетках, отвечают за так называемый фактор-1 (SDF-1/CXCL12) и его рецептор CXCR4, важные для хемотаксиса, дифференцировки, мобилизации и выживания гемопозитических СК и прогениторных клеток [107, 171].

Известно, что функциональность гемопозитических СК зависит от Gα-опосредованной сигнализации ТФР-β [243], а также внутриклеточной фосфатазы белка 2А [152, 243]. Мезенхимальные стволовые клетки обладают

достаточно выраженной пролиферативной активностью и при культивировании *in vitro* могут образовывать костную, жировую и хрящевую ткань, а также оказывают иммуномодулирующее действие [144, 145].

В работах [93, 247] показано, что в условиях культивирования ЯКККЧ *in vitro* образуются CD34⁺-клеток с высокой способностью к пролиферации. В работе [259] было показано, что плюрипотентные СК получают из различных типов соматических клеток. Особый научный интерес вызывает их способность к созданию из зрелой или незрелой клеточной популяции подобных к эмбриональным колониям популяций, которые, в свою очередь, способны генерировать различные клетки, ткани, органы в заданном направлении.

Таким образом можно сделать вывод, что на сегодняшний день существует много средств и методов для лечения ЛНР, однако по-прежнему остается высоким процент неблагоприятных исходов и осложнений, требующих проведения сложных оптико-реконструктивных операций. Стволовые клетки широко применяются в клинической практике: их эффективность доказана при лечении достаточно широкого спектра заболеваний. В связи с этим сохраняется актуальной проблема поиска новых эффективных патогенетически обоснованных методов, применение которых позволит уменьшить количество осложнений, сократить время оказания медицинской помощи и добиться положительных результатов.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Характеристика криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека

Методика получения ядродержащих клеток кордовой крови человека.

Объектом исследования была ЯКККЧ (70 образцов), которые получали из материнского конца пуповины после ее отделения у здоровых рожениц при доношенной беременности после подписания с ними информированного соглашения. Из цельной ЯКККЧ путем пассивной седиментации эритроцитов в градиенте плотности с добавлением полиглюкина получали лейкоконцентрат [137], который отбирали в стерильные флаконы, добавляли антикоагулянт CPD (цитратно-фосфатно-декстрозный раствор) с соблюдением асептики и антисептики перед обработкой хранили в бытовом холодильнике при 4°C.

Методика криоконсервирования ядродержащих клеток кордовой крови человека. Криоконсервировали лейкоконцентрат ЯКККЧ в одноразовых пластиковых пробирках по двухэтапной программе на программном замораживателе (ОП и СКТБ ИПКиК НАНУ) в растворе высокомолекулярного декстрана «Полиглюкин» («Юрия-Фарм», Украина) по методу А.А. Цуцаевой [23, 45]. Был использован следующий режим криоконсервирования: охлаждение от комнатной температуры до -5°C со скоростью 1 град/мин, стабилизация 5 мин, охлаждение до -60°C со скоростью 2 град/мин и погружение в жидкий азот в течение 45–50 с (до исчезновения твердой фазы) [137]. Образцы кЯКККЧ хранили в жидком азоте в низкотемпературном банке ИПКиК НАН Украины. Отогрев суспензии кЯКККЧ осуществляли на водяной бане при температуре 40–41°C в течение 45–50 с (до исчезновения твердой фазы) [31].

Из-за негативного влияния криоконсервирования использовали такой же препарат, содержащий сниженное количество декстрана (не более 0,4%),

который при традиционном способе выделения ЯКККЧ из кордовой крови находится в среде замораживания в концентрации 3,6% [46]. В обоих случаях при криоконсервировании применяли 2-этапный режим замораживания согласно методу [13].

2.2. Морфологические методы оценки криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови человека

Методика количественно-качественного анализа и сохранности ядросодержащих клеток кЯКККЧ. Количество кЯКККЧ подсчитывали в камере Горяева по общепринятой методике до замораживания и после отогрева [12]. До криоконсервирования и в первые 5 мин после отогрева определяли сохранность клеток кЯКККЧ с помощью экспресс-метода суправитального окрашивания 1%-го раствора трипанового синего [36].

Методика оценки фенотипических характеристик кЯКККЧ. Популяционный состав кЯКККЧ исследовали сразу после отогрева методом проточной цитофлуориметрии («FACS Calibur», «BD Biosciences», США) и программы «Win MDI» с использованием моноклональных антител к молекулам CD3, CD4, CD8, CD34 («BD», США) [57].

Методика исследования морфологического состава кЯКККЧ. Изучение морфологического состава кЯКККЧ проводили на мазках-отпечатках, окрашенных азур-II-эозином по Романовскому-Гимзе [48]. Мазки перед окраской фиксировали 96°C спиртом в течение 10 мин. Микроскопический учет клеток кЯКККЧ проводили в световом микроскопе (ЛОМО-2) по полям зрения, х900 (масляная иммерсия), выражая в процентах [48].

2.3. Характеристика экспериментального материала

Объект исследования. Экспериментальная работа была проведена на кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,0–2,5 кг (n=38; 76 глаз) в возрасте 6 месяцев в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в научных целях» (Страсбург,

1985), одобренным Национальным конгрессом Украины по биоэтике (Киев, 2003). Лабораторные животные содержались в условиях вивария ИПКиК НАН Украины и были использованы в экспериментальной работе согласно с рекомендациями [32].

2.4. Выполнение экспериментальной модели лимбальной недостаточности роговицы

Для обоснования применения кЯКККЧ при лечении ЛНР была выбрана экспериментальная модель ЛНР, разработанная Е.С. Милюдиным в нашей модификации [40]. При проведении экспериментальной работы для уменьшения болевых ощущений у кроликов мы не иссекали у животных 3-е веко, что является более гуманным методом.

Все манипуляции выполняли под местной анестезией роговицы кролика, которую проводили с применением проксиметакаина (препарат «Алкаин» («Alcon», США) в концентрации 0,5%.

Для моделирования экспериментальной ЛНР с применением митомицина С (ММС) из фильтровальной бумаги выкраивали диски диаметром 10 мм и пропитывали их 10%-м этиловым спиртом. Аппликацию диска на роговицу кролика выполняли в течение 20 с с последующим удалением микротупфером поверхностного эпителия роговицы. Контроль удаления роговичного эпителия выполняли с помощью окрашивания 1%-м раствором флуоресцина. Затем животным проводили повторную аппликацию диска, пропитанного 0,04%-м раствором ММС в течение 4 мин. Известно, что ММС препятствует росту клеток, что приводит к истощению камбиального слоя роговицы (рис. 2.4.1).



Рис. 2.4.1. Фотография глаза экспериментального животного в момент аппликации диска фильтровальной бумаги, пропитанного раствором ММС.

2.5. Группы животных

Все экспериментальные животные были разделены на следующие группы ($n = 38$; 76 пар очей): 1 – глаза кроликов с экспериментальной ЛНР и введением кЯКККЧ; 2 – с экспериментальной ЛНР без лечения; 3 – с экспериментальной ЛНР и введением нежизнеспособных кЯКККЧ; 4 – с экспериментальной ЛНР и введением физиологического раствора; 5 – интактная роговица кролика и введение кЯКККЧ; 6 – роговица здорового кролика.

С целью профилактики развития вторичной инфекции на всех глазах проводили местную антибактериальную терапию в виде инстилляций 0,25% раствора ципрофлоксацина 4 раза в сутки в течение 7 суток.

2.6. Оценка клинических показателей экспериментальных животных

Выраженность клинических симптомов оценивали по степени воспалительной реакции (табл. 2.6.1) и неоваскуляризации (табл. 2.6.2) по методу Ченцовой Е.В. [62, 63]. Площадь дефекта стромы роговицы оценивали по схеме Венворта [62] (табл. 2.6.3).

Интенсивность помутнения роговицы оценивали по шкале проф. В.В. Войно-Ясенецкого [14], которая представляет собой цветовую шкалу из 10 рядов дисков, цвет которых переходит от черного к почти белому (наибольшая и наименьшая прозрачность соответственно).

Наблюдение за клиническим течением репаративных процессов в глазах у экспериментальных животных проводили с использованием метода фокального освещения и осмотра роговицы с помощью щелевой лампы («Торсон», Япония).

Анализ клинических исследований у животных с экспериментальной ЛНР до и после лечения проводили на 2-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки.

Таблица 2.6.1

Оценка степени воспалительной реакции по методу Е.В. Ченцовой

Выраженность клинических симптомов	Оценка в баллах
Отсутствие воспалительной реакции	0
Незначительная смешанная инъекция конъюнктивы, незначительное отделяемое, отсутствие отека окружающей роговицы	1
Смешанная инъекция конъюнктивы, слизисто-гнойное отделяемое, отек бельма и окружающей его ткани роговицы	2
Выраженная смешанная инъекция конъюнктивы с хемозом, обильное слизисто-гнойное отделяемое, выраженный отек роговицы, гипопион, иридоциклит	3

Таблица 2.6.2

Оценка степени неоваскуляризации по методу Е.В. Ченцовой

Длина сосудов, мм	Выраженность клинических симптомов, баллы
Отсутствие сосудов	0
До 2 мм	1
До 4 мм	2
До 6 мм	3

Таблица 2.6.3

Оценка площади дефекта стромы роговицы по схеме Венворта

Выраженность клинических симптомов		Оценка в баллах
Площадь дефекта	До 1/4 площади роговицы	1
	1/4–1/2 площади роговицы	2
	Более 1/2 площади роговицы	3
Глубина дефекта	Отсутствие дефекта стромы	0
	Поверхностный дефект стромы	1
	Глубокий дефект без десцеметоцеле	2
	Десцеметоцеле	3
	Перфорация	4

2.7. Оценка гематологических показателей экспериментальных животных

Лабораторный анализ периферической крови. Определение количества лейкоцитов и эритроцитов в крови у кролей подсчитывали в камере Горяева по общепринятой методике. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) микрометодом Панченкова, гемоглобин [33, 56].

Морфологический состав клеток периферической крови (лейкоцитарная формула). Морфологический состав клеток периферической крови оценивали на мазках-отпечатках, окрашенных азур-II-эозином по Романовскому-Гимзе [48] в световом микроскопе «Primo Star» («Carl Zeiss», Германия; окуляр – х10, объектив – х90-иммерсия) подсчетом 500 клеток (в процентах).

2.8. Методы оценки показателей иммунной системы экспериментальных животных

Субпопуляционный состав клеток крови у кроликов определяли методом прямой мембранной иммуофлуоресценции на проточном цитофлуориметре «FACS Calibur» (США) с использованием флуоресцеин-изотиоцианат-меченных моноклональных антител (mouse anti rabbit; «Santa Cruz Biotechnological», США) к CD3, CD4, CD8 молекулам. Анализ результатов проводили на 3-и, 7-е и 14-е сутки в крови кроликов с экспериментальной ЛНР и после лечения.

2.9. Определение цитокинов ИФН-α и ИФН-γ в сыворотке крови, слезной жидкости кроликов с лимбальной недостаточностью роговицы и после лечения

Для исследования цитокинов (интерферонов) ИФН-α и ИФН-γ были выбраны: сыворотка крови и слезная жидкость как наиболее доступные и атравматичные при заборе биологические субстраты. Забор слезы (0,3–0,5 мл) проводили из нижнего конъюнктивального свода глаза в сухую герметичную пробирку.

Определение концентрации цитокинов у кролей с ЛНР и после лечения проводили в отделе криопатофизиологии и иммунологии (ИПКиК НАН Украины) с помощью иммуноферментного анализа на тест-системах (ООО «Цитокин», Россия) согласно инструкции производителя. Результаты регистрировали при длине волны 450 нм и выражали в пг/мл. В качестве контрольных значений использованы данные обследования 7 здоровых (интактных) кроликов одного возраста, у которых отсутствовали аутоиммунные заболевания различных органов и систем, в том числе офтальмологическая патология, способная влиять на активность воспалительного процесса.

2.10. Исследование концентрации ростовых факторов

Для исследования концентрации ростовых факторов из роговицы глаза кроликов готовили осветленный гомогенат, освобожденный центрифугированием от измельченных остатков ткани и клеток, который получали путем энуклеации. Для его получения брали 50 мг ткани роговицы глаза, измельчали в пробирке «Эппендорф» объемом 1,5 мл с помощью микро-гомогенизатора Поттера в физиологическом растворе на фосфатном буфере с pH 7,4 с добавлением 1 мМ ингибитора протеаз фенилметилсульфонилфлуорида. Соотношение ткань–раствор составляло 1:10. После получения гомогената его осветляли центрифугированием при 3000g в течение 10 мин. Надосадок собирали в отдельную пробирку для дальнейшего измерения содержания BDNF и TGF-1b.

Для исследования концентрации ростовых факторов BDNF и TGF-1b использовали высокочувствительные тест-системы: для измерения TGF-1b – тест-систему («DRG», США) с чувствительностью 2 пг/мл, для измерения BDNF – тест-систему «R&D Systems Quantikine» (США) с чувствительностью 20 пг/мл. Все измерения проводили с помощью метода иммуноферментного анализа с использованием полуавтоматического спектрофотометра для 96-луночных планшетов с вертикальным лучом «StatFax 2400» (США). Из пробирки осветленного гомогената дозатором брали 0,1 мл и переносили в лунки планшета, в котором в дальнейшем проводили реакцию связывания TGF-1b и BDNF с антителами дне лунок, специфически взаимодействующими по принципу антиген-антитело. Затем добавляли вторичные антитела, проводили ферментативную реакцию, которая давала окрашенный продукт. Измерение реакции этого окрашенного продукта проводили по данным предварительно настроенной калибровочной кривой.

2.11. Гистологический метод оценки структуры глаза кролика

С целью изучения структурных изменений глаза у кролика с экспериментальной ЛНР до и после лечения проводили гистологическое исследование. Из эксперимента животных выводили путем воздушной эмболии через ушную вену. Энуклеацию глаз проводили в соответствии со стандартной методикой [32].

Глаза животных после энуклеации фиксировали в 10%-м растворе формалина. Гистологические препараты готовили по стандартной методике [48], парафиновые срезы толщиной 6 мм окрашивали гематоксилин-эозином по Романовскому-Гимзе [48]. Микроскопию гистологических препаратов глаза кролика проводили в световом микроскопе «МДИ-6», об. 10, 40; ок.10.

2.12. Макрофотография

Фотографирование цитологических и гистологических препаратов проводили в световом микроскопе «Primo Star» («Carl Zeiss», Германия) с помощью цифровой камеры «Power Shot A 640» («Canon», Япония).

2.13. Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методу Стьюдента-Фишера с помощью программы «Statistica 7.0» (Stat Soft Inc., США), адаптированной к поставленным задачам и с учетом специфики данных [7].

РАЗДЕЛ 3

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Отработка экспериментальной модели лимбальной недостаточности роговицы кроликов

Для исследования влияния кЯКККЧ на восстановление роговицы у животных с ЛНР необходимо создание экспериментальной модели. Наиболее оправданной моделью ЛНР является аппликация 0,04%-го раствора ММС на поверхность лимба. Однако известно, что данное вещество обладает цитостатическим действием на клетки роговицы и кЯКККЧ, потому необходимо знать точное время его выведения из роговицы. В связи с этим нами была применена модель, адаптированная к условиям проводимого эксперимента с целью получения достоверных результатов и нивелирования цитостатического действия ММС как на саму роговицу глаза, так и на кЯКККЧ.

Для разработки модели ЛНР в эксперименте участвовало 3 кролика (6 глаз). В результате измерения роговицы при помощи штангенциркуля были отобраны кролики с одинаковым диаметром роговицы – 10 мм. Также каждому животному была выполнена пахиметрия на ультразвуковом пахиметре «Ocuscan» («Alcon», США) Толщина роговицы в центре и по периферии в среднем составляла (420 ± 15) мкн. Для удобства расчетов данная величина была переведена в сантиметры (0,042 см).

Перед нанесением ММС на роговицу выполняли аппликацию диска фильтровальной бумаги (диаметр – 10 мм), пропитанную 10%-м раствором этилового спирта. Время аппликации составляло 20 с. Затем с помощью микротупфера удаляли некротизированные эпителиальные клетки роговицы. Удаление эпителиального слоя роговицы контролировалось стандартным способом – его окрашиванием 1%-м раствором флуоресцеина (рис. 3.1.1).



Рис. 3.1.1. Роговица кролика после окраски 1%-м раствором флуоресцеина после удаления некротизированных участков эпителия роговицы.

Для приготовления исходного испытуемого раствора флакон препарата, содержащий 2 мг ММС, растворяли в 5 мл дистиллированной воды (конечная концентрация вещества составила 0,04%). Из фильтровальной бумаги вырезали семь дисков диаметром 10 мм, на шесть из которых непосредственно перед экспонированием на роговицу глаза с помощью мерной автоматической пипетки точечно наносили 7 мкл приготовленного раствора ММС. Седьмой диск (контрольный) на роговицу глаза не экспонировали. Экспонирование аппликатора на роговицу глаза проводили с различными интервалами времени: 30 с, 1, 2, 3, 4, 5 мин. После экспонирования аппликатор помещали в пробирку объемом 20 мл и герметично закрывали резиновой пробкой. Затем в каждую пробирку добавляли по 2 мл метилового спирта. Пробирки помещали в ультразвуковую баню на 5 мин. Концентрацию ММС в образцах определяли методом жидкостной хроматографии с применением диодноматричной детекции. В качестве разделяющей колонки использовали колонку с октадецилсилильной привитой фазой, имеющей трехкратное эндкипирование. Длина волны с максимумом поглощения ММС составила 360 нм, что обеспечило достаточно высокую селективность сигнала в сочетании с низким порогом его обнаружения в пробах. Элюирование проб проводили в градиентном режиме

для двух фаз – ацетонитрила и фосфатного буфера pH 3,0 с концентрацией ионопарной добавки гептансульфоната натрия, которая составила 0,01 М (табл. 3.1.1; рис. 3.1.2).

Таблица 3.1.1

Концентрация количественного определения ММС в пробах

Концентрация ММС, %	Площадь пика	Время экспонирования, мин
0,03971519	703648	0,5
0,03715364	658264	1
0,03551022	629147	2
0,03221181	570708	3
0,03001634	531810	4
0,03001182	531730	5
0,04	708694	0

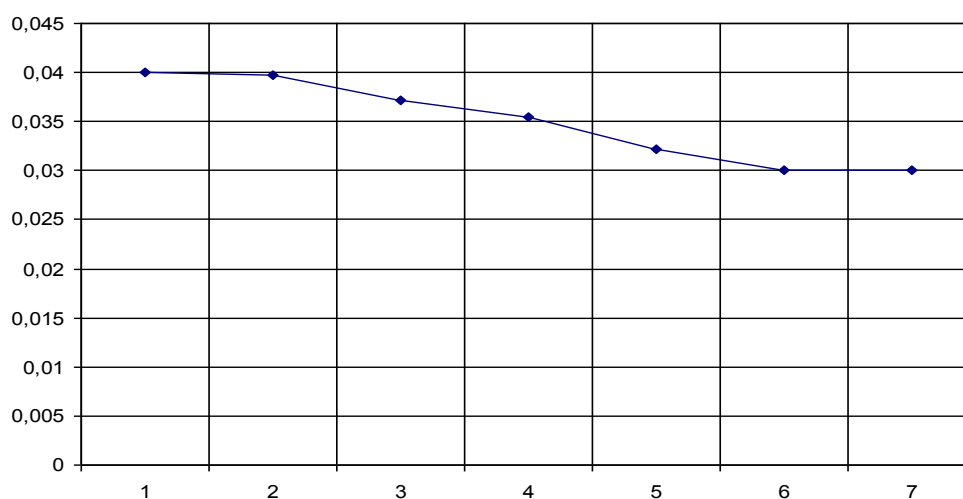


Рис. 3.1.2. Скорость диффузии ММС из роговицы глаза кролика (v) (1,99764E-05 г/мин или 19,97635 мкг/мин).

Объем ММС вычислили по стандартной формуле: $V=2\pi R$. Время выведения ММС из роговицы определяли по формуле

$t=V/v$, где V – объем ММС; v – скорость диффузии.

$$t = 2\pi R/v = 2 \times 3,14 \times 0,021 / 1,99764 \text{E} - 05 = 26,2 \text{ ч.}$$

Полученный результат определил возможность применения кЯКККЧ для лечения ЛНР.

Данное исследование показало, что разработанная модель ЛНР с аппликацией 0,04%-го раствора на роговицу ММС является одной из самых простых и надежных, поскольку для ее создания необходимо минимальное время, а полное выведение препарата происходит в течение суток.

По результатам данного раздела была опубликована работа:

Свидко Е.Н. Экспериментальная модель лимбальной недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия для исследования действия криоконсервированных клеток крови / [Свидко Е.Н., Демин Ю.А.] // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №2. – С. 226.

3.2. Отработка метода введения и дозы криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека

Существуют различные методы введения СК в организм и, в частности, в орган зрения – глаз: внутривенное, парабульбарное, ретробульбарное и субконъюнктивальное. Нами был выбран наиболее патогенетически обоснованный метод введения клеток для лечения ЛНР при котором клетки доставляются в строму роговицы. Кроме того, выбранный метод введения медицинских препаратов применяют непосредственно при лечении тяжелых хронических воспалительных процессов и язв роговицы.

Введение кЯКККЧ в условиях данного эксперимента проводили с помощью инсулинового шприца под увеличительной лупой в каждый из шести основных меридианов зоны лимба (рис. 3.2.1).

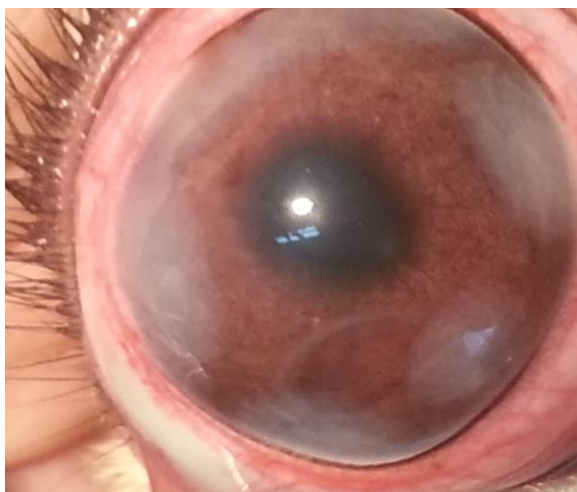


Рис. 3.2.1. Фотография роговицы глаза кролика после введения кЯКККЧ через сутки после ЛНР.

Для отработки дозы вводимых кЯКККЧ все кролики были разделены на четыре группы (по 6 животных в каждой). В один глаз кролика каждой группы вводили по 0.5мл кЯКККЧ в разной дозе: группа 1 – $0,3 \times 10^6$; группа 2 – $0,5 \times 10^6$; группа 3 – 1×10^6 клеток. В другой глаз вводили физраствор в том же объеме. Анализ проводили на 7-е сутки после введения кЯКККЧ.

В группе 1 отмечали глубокое помутнение роговицы, процессы регенерации имели замедленный характер, сохранялся эпителиальный дефект (рис. 3.2.2).



Рис. 3.2.2. Фотография роговицы глаза кролика с экспериментальной ЛНР на 7-е сутки после введения кЯКККЧ в дозе $0,3 \times 10^6$. Выраженное помутнение роговицы.

В группе 2 отмечали лечебный эффект с наилучшим протеканием репаративных процессов в роговице, на 7-е сутки наблюдали восстановление поверхностного слоя эпителия (рис. 3.2.3).

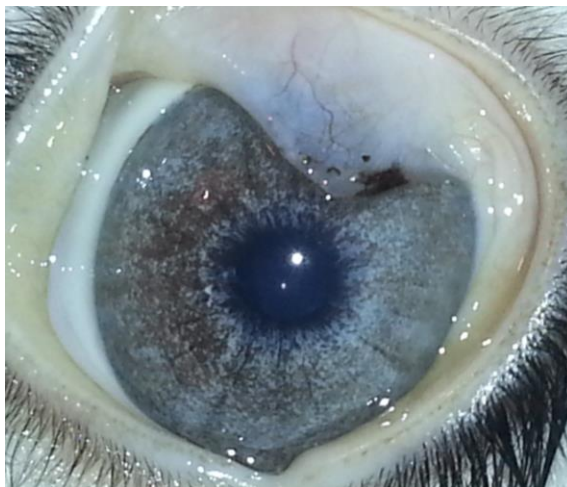


Рис. 3.2.3. Фотография роговицы глаза кролика с экспериментальной ЛНР на 7-е сутки после введения кЯКККЧ в дозе $0,5 \times 10^6$. Восстановление дефекта эпителия роговицы.

В группе 3 отмечали отек роговицы и реактивное воспаление оболочек глазного яблока, регенерация протекала вяло (рис. 3.2.4).



Рис. 3.2.4. Фотография роговицы глаза кролика с экспериментальной ЛНР на 7-е сутки после введения кЯКККЧ в дозе 1×10^6 . Отек роговицы и реактивное воспаление оболочек глазного яблока.

На основании полученных результатов исследования для проведения экспериментальной работы по лечению животных с экспериментальной ЛНР введением кЯКККЧ была выбрана доза клеток $0,5 \times 10^6$ в 0,5 мл.

По результатам данного раздела была опубликована работа:

Svidko K.M. Clinical and pathomorphological substantiation of application of cryopreserved blood cells to compensate corneal limbal deficiency / [Svidko K.M., Demin Yu.A.]// Biological and clinical aspects of the use of somatic cells in regenerative medicine. – 2013. – p. 41.

3.3. Влияние криоконсервирования на сохранность ядросодержащих клеток кордовой крови человека

В современной клинической практике широко применяется кордовая (пуповинная) кровь человека, в единице объема которой содержится больше гемопоэтических стволовых клеток и предшественников зрелых клеточных типов по сравнению с периферической кровью взрослого человека и примерно такое же их количество, как в костном мозге [17].

Плазма пуповинной крови содержит комплекс биологически активных компонентов: гормонов, интерлейкинов, интерферонов, ростовых факторов, ферментов и проферментов, витаминов и микроэлементов, гемопоэтинов и адаптогенов, эндорфинов и энкефалинов в физиологически сбалансированных соотношениях [18, 29].

Криоконсервирование является безальтернативным методом хранения ядросодержащих клеток, в том числе и кордовой крови [30, 52].

Метод криоконсервирования ядросодержащих клеток кордовой крови человека (ЯКККЧ) в аутологичной плазме разработан на базе Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины и может использоваться в клинической практике сразу после размораживания, поскольку была применена безотмывочная технология криоконсервирования [12, 13].

Установлено, что после отогрева кЯКККЧ количество ядродержащих и относительное количество сохранных клеток достоверно не изменялось по сравнению с их содержанием в нативных образцах и оставалось на достоверно высоком уровне (табл. 3.3.1, рис. 3.3.1).

Таблица 3.3.1

Количество ядродержащих, сохранных и колониеобразующих единиц клеток после кЯКККЧ (n=7)

Образцы	Количество ядродержащих клеток, $\times 10^7/\text{мл}$	Относительное количество сохранных клеток, %	Количество КОЕк, %
ЯКККЧ	$1,5 \pm 0,38$	$97 \pm 0,9$	$2,7 \pm 0,86$
кЯКККЧ	$1,35 \pm 0,32$	$86 \pm 1,6^*$	$2,5 \pm 0,43$

Примечание: * – различия значимы ($p < 0,05$) по сравнению с ЯКККЧ.

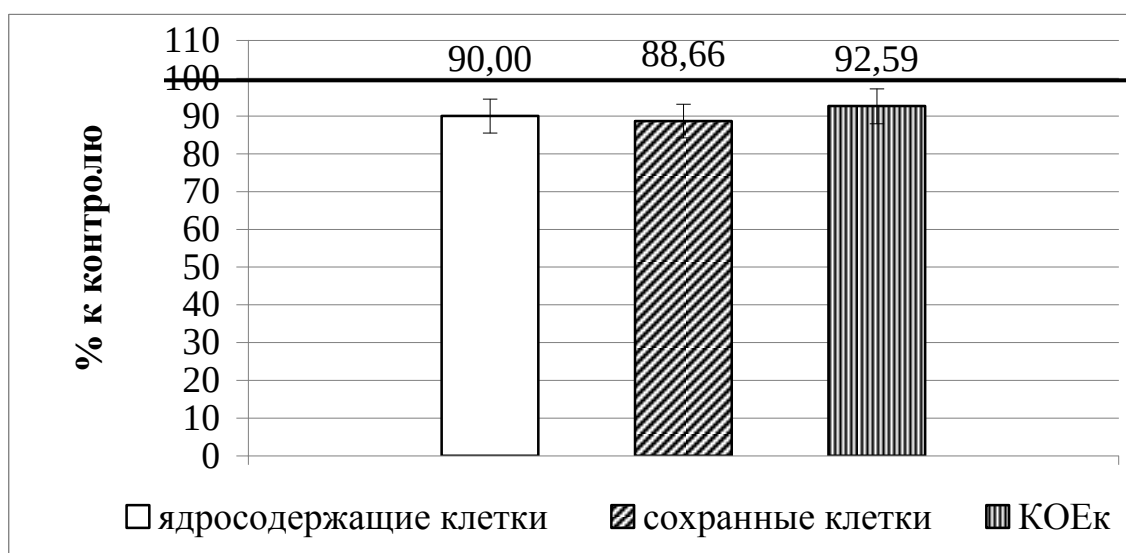


Рис. 3.3.1. Количество ядродержащих, сохранных клеток и колониеобразующих единиц клеток после криоконсервирования ЯКККЧ.

В нативной суспензии ЯКККЧ были определены следующие клеточные популяции: лимфоциты, небольшое количество нейтрофилов, моноциты и

крупные клетки с большим гипохромным ядром и гипохромной цитоплазмой, которые были отнесены к недифференцированным. Сразу после отогрева в клеточном спектре лейкоконцентрата преобладали лимфоциты, значимо увеличивалось относительное количество недифференцированных клеток, а относительное количество нейтрофилов значимо уменьшилось (рис. 3.3.2).

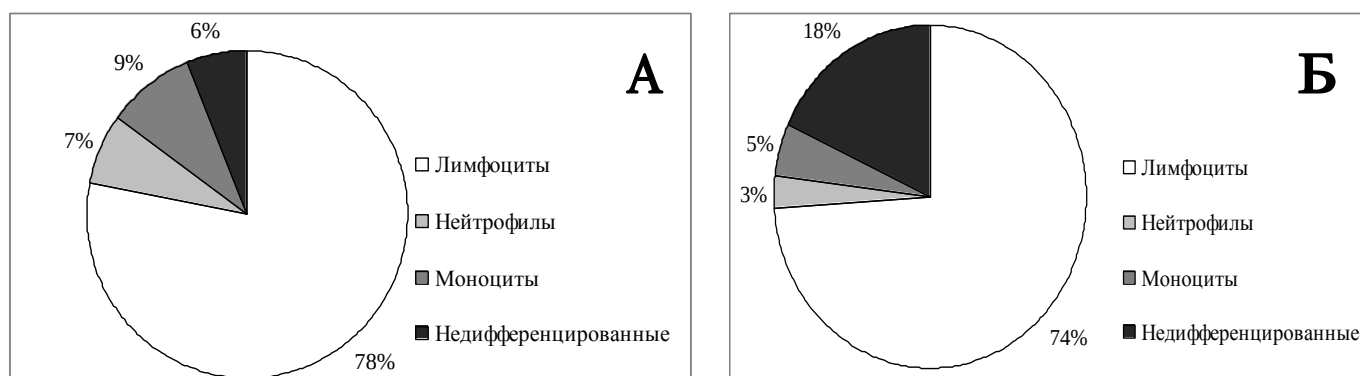


Рис. 3.3.2. Клеточный состав ЯКККЧ до (А) и после (Б) криоконсервирования.

3.4. Влияние криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови человека на показатели крови кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточностью роговицы

Исследование крови – обязательный этап применения при лечении заболеваний глаз, поскольку многие формы офтальмопатологии являются проявлением системных иммунозависимых заболеваний и ассоциируются с поражением других органов [72], например увеиты при синдромах Бехчета, Фогта-Коянаги-Харады, ревматоидные увеиты, диабетическая ретинопатия [86, 112, 137].

В настоящее время для восстановления показателей крови при лечении воспалительных процессов различной этиологии применяют криоконсервированную кордовую кровь [47, 50].

Полученные данные свидетельствуют о том, что при развитии ЛНР в

крови кроликов всех опытных групп повышалось количество лейкоцитов. В крови животных групп 2 и 4 данный показатель существенно повысился на 2-е и 3-и сутки после выполнения ЛНР. К 7-м суткам у животных этих групп отмечено увеличение количества лейкоцитов, которое хотя и снизилось к 14-м суткам, но все же превышало показатели контроля (группа 6). У кроликов группы 3, которым вводили разрушенные клетки кЯКККЧ, на 7-е сутки количество лейкоцитов в крови уменьшилось, однако на 14-е сутки этот показатель был значимо выше, чем у животных группы 6 ($p > 0,05$). У кроликов группы 5 с 3-х по 7-е сутки количество лейкоцитов в крови также увеличилось, а снизилось только на 14-е сутки. У кроликов, которым вводили кЯКККЧ (группа 1) положительная динамика снижения количества лейкоцитов в крови была отмечена уже на 3-и сутки, к 7-м суткам данный показатель снизился незначительно, а на 14-е сутки практически соответствовал норме (табл. 3.4.1; рис. 3.4.1).

Таблица 3.4.1

Изменение количества лейкоцитов ($\times 10^9/\text{мл}$) в крови кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы и после лечения

Группа животных	Сроки после выполнения ЛНР, сутки			
	2	3	7	14
1	$(7,2 \pm 1,2)^6$	$6,9 \pm 1,0$	$6,8 \pm 0,8$	$6,4 \pm 1,4$
2	$(8,4 \pm 1,4)^{1,6}$	$(8,2 \pm 1,5)^{1,6}$	$(9,6 \pm 1,4)^{1,6}$	$(8,3 \pm 1,3)^{1,6}$
3	$(7,8 \pm 1,2)^6$	$(8,0 \pm 1,2)^{1,6}$	$7,0 \pm 1,0$	$(7,0 \pm 1,4)^1$
4	$(8,0 \pm 1,0)^{1,6}$	$(8,7 \pm 1,3)^{1,6}$	$(9,3 \pm 1,1)^{1,6}$	$(7,9 \pm 1,6)^{1,6}$
5	$(7,4 \pm 1,4)^6$	$(7,8 \pm 1,2)^{1,6}$	$(8,9 \pm 1,1)^{1,6}$	$(7,0 \pm 1,0)^6$
6	$6,5 \pm 1,0$	—	—	—

Примечание: различия значимы ($p < 0,05$) по сравнению с группами: ¹ – 1, ⁶ – 6 в соответствующие сроки.

Результаты исследования лейкоцитарной формулы крови у кроликов с экспериментальной ЛНР и после лечения показали, что в группах 2 и 4 нейтрофилез со сдвигом влево был более значимым во все сроки наблюдения, чем у кроликов, которых лечили введением кЯКККЧ (табл. 3.4.2; рис. 3.4.2). Изменения в клеточном составе крови у кролей с экспериментальной ЛНР касались значительного снижения количества лимфоцитов ($p < 0,05$). Данный факт может свидетельствовать о стресс-индуцированной реакции при ЛНР и о снижении количества лимфоцитов вследствие их гибели.

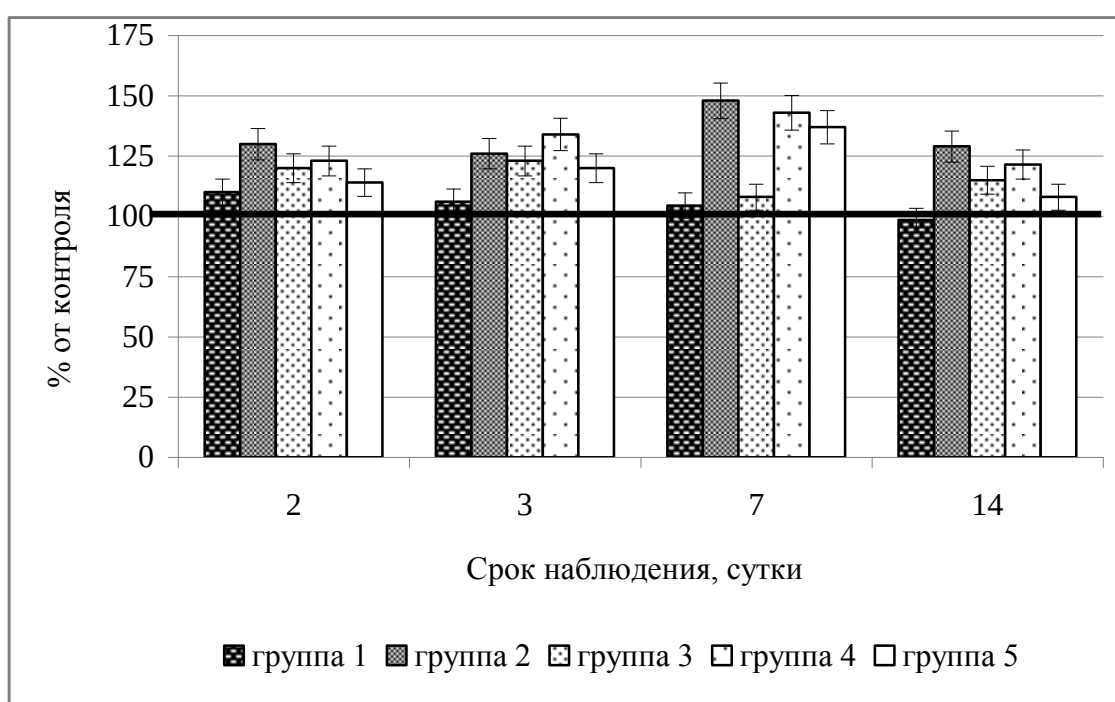


Рис. 3.4.1. Количество лейкоцитов в крови кроликов с экспериментальной ЛНР и после лечения. За 100% принимали данные контроля (К).

Изменения формулы крови отмечались со 2-х по 7-е сутки. Полученные результаты свидетельствуют об ответе иммунной системы (ИС) на развитие патологии (табл. 3.4.2; рис. 3.4.2). На фоне применяемой терапии кЯКККЧ с антибиотиком у животных группы 1 уже с третьих суток отмечали восстановление формулы крови (табл. 3.4.2; рис. 3.4.2, Б).

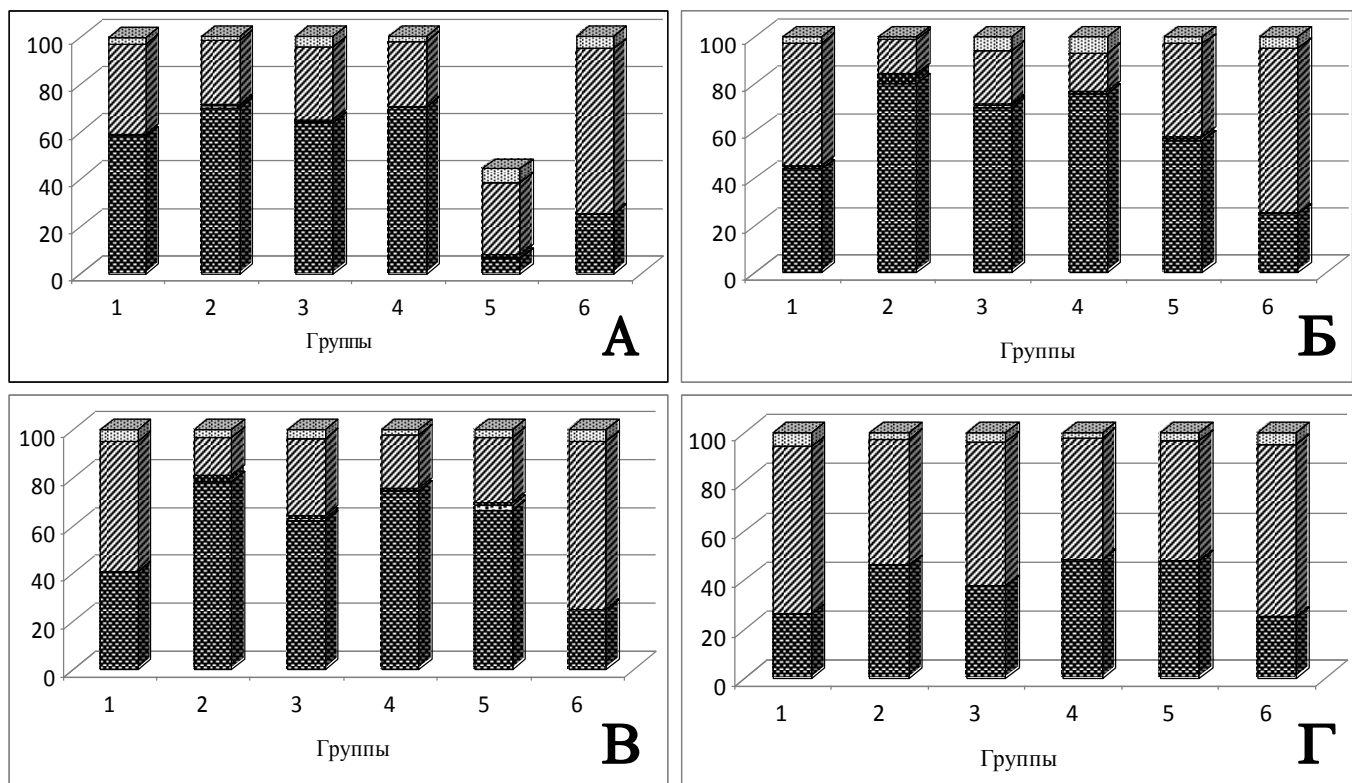


Рис. 3.4.2. Лейкоцитарная формула крови кроликов после выполнения ЛНР и лечения на 2-е (А), 3-и (Б), 7-е (В), 14-е (Г) сутки.

На 7-е сутки исследования у животных группы 6 примерно в два раза снизился процент нейтрофилов и повысился процент лимфоцитов (табл. 3.4.2; рис. 3.4.2, В), а на 14-е сутки этот показатель соответствовал норме (табл. 3.4.2; рис. 3.4.2, Г). После применения разрушенных клеток кЯКККЧ изменение лейкоцитарной формулы крови у кроликов (группа 3) в течение всего периода наблюдения имело значимые различия по сравнению с группами 1 и 6 (табл. 3.4.2; рис. 3.4.2).

Таблица 3.4.2

Лейкоцитарная формула крови кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы и после лечения

Группа живот- ных	Сроки после экспериментальной ЛНР, сутки																			
	2				3					7					14					
	Н	Э	Б	Л	М	Н	Э	Б	Л	М	Н	Э	Б	Л	М	Н	Э	Б	Л	М
1	58,2 ^{6±}	0	0,8 ^{6±}	38,0 ^{6±}	3,0 ^{6±}	43,8 ^{6±}	0	1,4 ^{6±}	52,0 ⁶	2,8 ^{6±0,6}	40,5 ^{6±}	0	0	54,7 ^{6±}	4,8±	26,0±	0	0	68,4	5,6±
	5,2		0,2	3,8	1,0	4,2		0,4	±5,4		4,5			5,5	1,2	2,8			±6,0	1,2
2	70,0 ^{1.6}	1,0 ^{1.6}	0,7 ^{1±}	27,5 ^{1.6±}	1,3 ^{6±}	80,0 ^{1.6±}	0	4,2 ^{1.6}	14,5 ^{1.6±}	1,3 ^{1.6±}	78,5 ^{1.6±}	0	2,5 ^{1.6±}	16,0 ^{1.6±}	3,0±	46,0±	0	0	51,2±	2,8±
	±3,0	±0,1	0,3	0,5	0,03	4,0		±1,2	2,5	0,3	7,5		0,5	2,0	1,0	4,5			5,2	0,8
3	64,0 ^{1.6}	0	1,0 ^{1.6}	31,0 ^{6±}	4,0±	70,0 ^{1.6±}	0,8 ^{1.6}	0,7 ^{1.6}	22,5 ^{1.6±}	6,0 ^{1.6±}	62,0 ^{1.6±}	1,0 ^{1.6}	1,0 ^{1.6±}	32,4 ^{1.6±}	3,6±	37,5±	0	0	58,7±	3,8±
	±4,0		±0,02	2,0	0,8	6,0	±0,02	±0,03	2,5	3,0	6,0	±0,2	0,2	3,0	1,6	3,5			5,7	1,8
4	70,2 ^{1.6}	0	0	27,8 ^{1.6±}	2,0 ^{6±}	76,0 ^{1.6±}	0	1,0 ^{6±}	15,9 ^{1.6±}	7,2 ^{1.6±}	74,5 ^{1.6±}	0	1,3 ^{1.6±}	22,0 ^{1.6±}	2,2±	48,6±	0	0	49,3±	2,1±
	±2,5			2,8	0,7	5,0		0,2	1,3	1,0	7,5		0,3	2,0	0,2	4,9			4,3	0,9
5	62,0 ^{6±}	0	2,0 ^{1.6}	30,0 ^{1.6±}	6,0 ^{6±}	55,0 ^{1.6±}	0	1,5 ^{6±}	39,7 ^{1.6±}	3,0 ^{6±}	66,5 ^{1.6±}	2,0 ^{1.6}	1,0 ^{1.6±}	27,5 ^{1.6±}	3,0±	48,0±	0	0	49,0±	3,0±
	2,0		±2,0	2,0	1,0	5,7		0,5	3,3	0,5	6,0	±0,2	0,1	2,7	1,0	5,8			5,0	1,0
6	25,0 ^{1±}	0	0	70,0 ^{1±}	5,0 ^{1±}															
	2,0			1,5	0,5															

Примечание: нейтрофилы (н), эозинофилы (э), базофилы (б), лимфоциты (л) – количество клеток, выраженное в %;

различия значимы ($p < 0,05$) по сравнению с группами: ¹ – 1; ⁶ – 6 в соответствующие сроки.

Известно, что развитие в организме воспалительного процесса влияет и на состояние эритроцитов крови [9]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что уже на 2-е сутки развития патологии во всех опытных группах (за исключением группы 5) снизилось количество эритроцитов в крови (табл. 3.4.3; рис. 3.4.3).

Таблица 3.4.3

Изменение количества эритроцитов ($\times 10^6/\text{мл}$) в крови кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы и после лечения

Группа животных	Срок после выполнения ЛНР, сутки			
	2	3	7	14
1	$5,8 \pm 1,8^6$	$7,0 \pm 0,6^6$	$6,9 \pm 1,0^6$	$7,9 \pm 1,0$
2	$5,4 \pm 1,4^6$	$5,2 \pm 1,5^{1.6}$	$5,0 \pm 1,0^{1.6}$	$6,4 \pm 1,0^{1.6}$
3	$5,8 \pm 1,1^6$	$6,3 \pm 1,3^{1.6}$	$6,7 \pm 0,7^6$	$7,0 \pm 1,4^{1.6}$
4	$5,0 \pm 1,0^{1.6}$	$5,3 \pm 1,3^{1.6}$	$5,2 \pm 1,2^{1.6}$	$6,7 \pm 0,7^{1.6}$
5	$7,9 \pm 0,9^{1.6}$	$7,2 \pm 1,2^1$	$7,8 \pm 0,8^1$	$7,6 \pm 1,0$
6	$7,5 \pm 1,7$	$7,6 \pm 1,7$	$7,8 \pm 1,7$	$7,4 \pm 1,6$

Примечание: различия значимы ($p < 0,05$) по сравнению с группами (1 – группа 1; 6 – группа 6 в соответствующие сроки).

В данном случае причиной недостаточного содержания эритроцитов в периферическом русле крови у животных с экспериментальной ЛНР может быть не только ингибция пролиферации и дифференцировки клеток эритроидного ростка кроветворения, но и их диапедез в разные органы и

ткани за счет повышения проницаемости сосудов при воспалительном процессе.

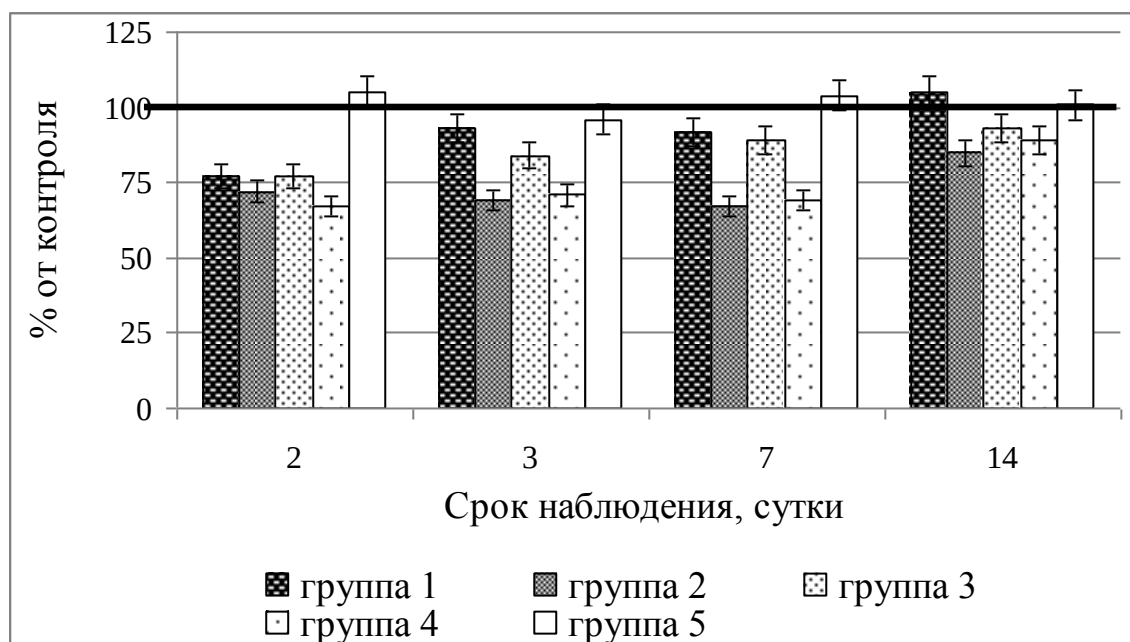


Рис. 3.4.3. Количество эритроцитов в крови у кроликов с экспериментальной ЛНР и после лечения; за 100 % приняты данные контроля (К).

У животных группы 1 уже на 3-и сутки после введения кЯКККЧ количество эритроцитов в крови начало повышаться. При этом на 7-е сутки данный показатель не достигал уровня нормы, однако значимо ($p < 0,05$) его превышал по сравнению с таковым в других группах. На 14-е сутки количество эритроцитов в крови животных этой группы превышало показатели нормы. Данный факт свидетельствует о том, что введение кЯКККЧ способно быстро мобилизовать организм животного для вывода эритроцитов в кровотоки как из депо (селезенка), так и участков их формирования (костный мозг).

При исследовании содержания гемоглобина в крови животных с экспериментальной ЛНР (группа 2) было установлено его снижение во все сроки наблюдения (табл. 3.4.4; рис. 3.4.4). У кроликов группы 1 после

введения кЯКККЧ положительная динамика повышения содержания гемоглобина была очевидной уже на 3-и сутки, а на 7-е сутки данный показатель оставался ниже нормы (группа 6), но был выше, чем в других опытных группах. На 14-е сутки у кроликов группы 1 содержание гемоглобина несколько превышало норму (группа 6).

Таблица 3.4.4

Содержание гемоглобина в крови (гр/л) у кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы и после лечения

Группа животных	Сроки после выполнения ЛНР (сутки)			
	2	3	7	14
1	$(99,9 \pm 1,0)^6$	$(102,5 \pm 1,5)^6$	$(116,0 \pm 2,2)^6$	$123,0 \pm 4,0^6$
2	$(90,3 \pm 2,3)^{1,6}$	$(86,0 \pm 6,0)^{1,6}$	$(82,0 \pm 8,0)^{1,6}$	$(98,4 \pm 1,8)^{1,6}$
3	$(92,8 \pm 0,1)^{1,6}$	$(93,0 \pm 1,2)^{1,6}$	$(98,0 \pm 0,4)^{1,6}$	$(110,0 \pm 2,0)^{1,6}$
4	$(88,8 \pm 2,2)^{1,6}$	$(86,4 \pm 2,8)^{1,6}$	$(90,0 \pm 2,2)^{1,6}$	$(93,8 \pm 2,2)^{1,6}$
5	$(98,2 \pm 0,1)^{1,6}$	$(90,8 \pm 2,2)^{1,6}$	$(106,3 \pm 3,6)^{1,6}$	$(109,8 \pm 2,8)^{1,6}$
6	$120,5 \pm 2,8$	—	—	—

Примечание: различия значимы ($p < 0,05$) по сравнению с группами ($^1 - 1$; $^6 - 6$ в соответствующие сроки).

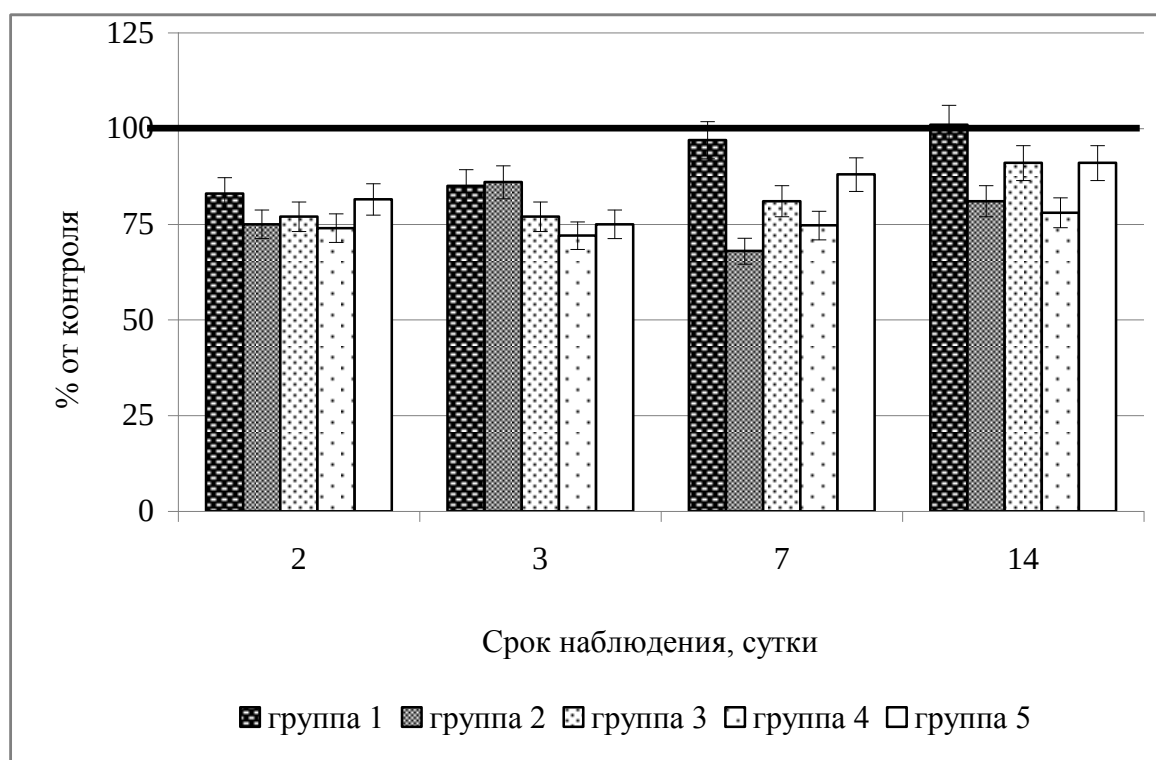


Рис. 3.4.4. Количество гемоглобина в крови у кроликов с экспериментальной ЛНР и после лечения; за 100 % приняты контроля (К).

Одним из манифестных проявлений развития воспалительного процесса является показатель СОЭ, ускорение которого не является специфическим для какого-либо заболевания, но всегда указывает на наличие воспалительного процесса в организме [9]. Причиной этого является уменьшение числа эритроцитов, изменение соотношений различных фракций белков крови, фибриногена, а также повышение ее вязкости крови. Так, со 2-х суток развития патологии у животных группы 2 увеличился показатель СОЭ на фоне повышения вязкости крови, снижения количества эритроцитов и увеличения лейкоцитов. Признаки сохраняющегося воспалительного процесса у животных при развитии ЛНР подтверждаются увеличением показателя СОЭ, вплоть до 14-х суток (табл. 3.4.5; рис. 3.4.5).

Таблица 3.4.5

Показатели СОЭ в крови (мм/ч) кроликов с экспериментальной
лимбальной недостаточности роговицы и после лечения

Группа животных	Сроки после индукции ЛНР, сутки			
	2	3	7	14
1	2,9±0,4 ⁶	2,7±0,02 ⁶	2,6±0,2	2,5±0,4
2	3,2±0,4 ^{1,6}	3,4±0,5 ^{1,6}	3,3±0,1 ^{1,6}	3,4±0,8 ^{1,6}
3	2,8±0,1 ^{1,6}	2,9±0,2 ^{1,6}	2,6±0,2	2,5±0,6 ⁶
4	3,2±3,2 ^{1,6}	3,4±0,8 ^{1,6}	3,4±0,2 ^{1,6}	3,4±0, ^{1,6}
5	3,2±0,1 ^{1,6}	3,0±0,2 ^{1,6}	2,8±0,3 ^{1,6}	2,6±0,6 ^{1,6}
6	2,5±0,2	2,3±0,2	2,2±0,2	2,5±0,2

Примечание: различия значимы ($p < 0,05$) по сравнению с группами:

¹ – группа 1, ⁶ – группа 6 в соответствующие сроки.

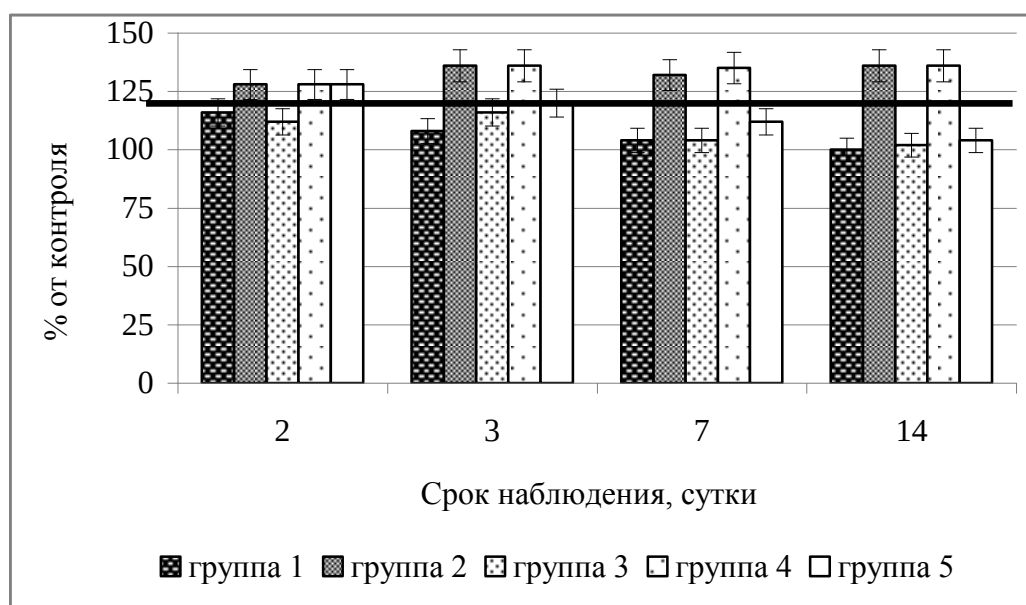


Рис. 3.4.5. Показатели СОЭ в крови кроликов с экспериментальной ЛНР и после лечения; за 100 % приняты данные контроля (К).

Следует отметить, что изменения показателей СОЭ во всех группах опытных животных находились в пределах одних и тех же величин и не имели выраженных различий по сравнению с контролем, как другие показатели. Исключение составляли животные групп 2 и 4, которым проводили терапию ЛНР антибиотиком и введением физраствора. Показатель СОЭ превышал контрольную величину во все сроки исследования.

Таким образом, выполненное экспериментальное исследование продемонстрировало выраженную эффективность применения кЯКККЧ в лечении ЛНР, которая выражалась в восстановлении показателей периферической крови.

По результатам данного раздела была опубликована работа:

Свидко Е.Н. Влияние криоконсервированной кордовой крови на показатели крови кроля при лимбальной недостаточности роговицы / [Свидко Е.Н., Бондарович Н.А., Останков М.В., Демин Ю.А., Гольцев А.Н.] // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2014. – Т. 62, №1. – С. 36–44.

3.5. Оценка иммунной системы кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточностью роговицы до и после лечения криоконсервированными ядродержащими клетками кордовой крови человека

Неблагоприятное влияние некроза на течение ЛНР связано с аутоинтоксикацией и аутосенсibilизацией организма, в результате иммунологически толерантные ткани глаза становятся источником антигенной информации, что приводит к развитию аутоиммунных реакций, сопровождающихся нарушениями иммунной системы как на уровне поврежденного органа, так и всего организма [61, 83]. Эти

нарушения в свою очередь оказывают влияние на течение посттравматического периода и формирование осложнений [76]. В патогенезе ЛНР важное значение имеет аутоиммунный компонент. Развитие аутоиммунных реакций сопряжено с ослаблением Т-супрессорного звена и изменением соотношения иммунорегуляторных субпопуляций Т-клеток. Косвенным показателем аутоиммунного процесса может быть повышение до 0,2 и выше иммунорегуляторного индекса (ИРИ). Показателями процесса аутоиммунизации являются клеточный иммунный ответ и антигены, направленные против тканей глаза. Ослабление Т-супрессорного звена, способствующее усилению аутоиммунных реакций, ассоциируется с угрозой развития симпатической офтальмии [207]. Важно иметь в виду, что органоспецифические реакции могут развиваться не только при «истинно» аутоиммунных формах офтальмопатологии. Эти реакции являются частью иммунного ответа на травму, инфекцию, сосудистые изменения и другие повреждающие факторы при ряде глазных заболеваний неаутоиммунной природы. Выраженное и длительное усиление иммунного ответа на антигены измененных тканей свидетельствует о нарушении органоспецифического аутоиммунитета. В таких случаях аутоиммунные реакции могут быть одним из ключевых или доминирующих патогенетических факторов офтальмопатологии [194]. В некоторых ситуациях для устранения иммунодефицитных состояний применяют иммуностимуляторы. С этой целью используют индукторы интерферона «Тактивин», «Левамизол» и т. д. Следует учитывать, что чрезмерная иммуностимуляция или «заместительная» цитокиноterapia также могут вызвать осложнения [11, 24]. Так, вследствие применения препаратов интерферона у больных гепатитами и другими соматическими заболеваниями происходят изменения в структурах глаза (внутриглазные кровоизлияния, ретинопатия и ретинит, нейропатия, оваскулярная глаукома и др.). Оптимальным представляется применение иммунокорректоров – средств, позволяющих

нормализовать нарушенные параметры иммунитета: ослабить гиперреактивность и повысить сниженные показатели, при этом не влияя на нормальные. К таким препаратам относятся «Миелопид» (ГНЦ Институт иммунологии, Россия), «Иммунофан» (ООО НПП «Бионокс», Россия); иммунокорректирующий эффект могут дать «Тактивин» («Биомед», Россия), «Левамизол» («Здоровье», Украина), «Полудан» (ООО «ЛЭНС-ФАРМ», Россия). Кроме того, в таких случаях применяют экстракорпоральные методы (плазмаферез, гемосорбция) в комплексе с введением малых доз кортикостероидов [39, 59, 60]. В последнее время как в экспериментальной, так и клинической практике в качестве иммунокорректора при различных заболеваниях применяют кордовую кровь [124, 163, 232, 260], для длительного хранения которой создаются низкотемпературные банки [187].

В результате проведенных исследований было установлено, что уже на 3-е сутки после выполнения экспериментальной ЛНР у животных наблюдалось нарушение Т-клеточного звена иммунитета. На 3-и сутки у кроликов группы 2, как и у леченных физраствором (группа 4), изменение иммунной системы характеризовалось стойким снижением количества общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$). Количество общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$) незначительно увеличилось на 7-е сутки, но и на 14-е значимо было ниже контрольных показателей ($p < 0,05$) (табл. 3.5.1; рис. 3.5.1).

Таблица 3.5.1

Концентрация общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$) в крови кроликов с лимбальной недостаточности роговицы и после лечения

Группа животных	Сутки после лечения		
	3	7	14
1	16,8±0,8	16,1±0,8	16,6±0,8
2	6,7±0,3	7,6±0,4	7,2±0,4
3	12,5±0,6	14,6±0,7	14,8±0,7
4	9,6±0,5	11,6±0,6	7,8±0,4
5	22,4±1,1	22,0±1,2	22,2±1,1

Примечание: различия значимы по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$).

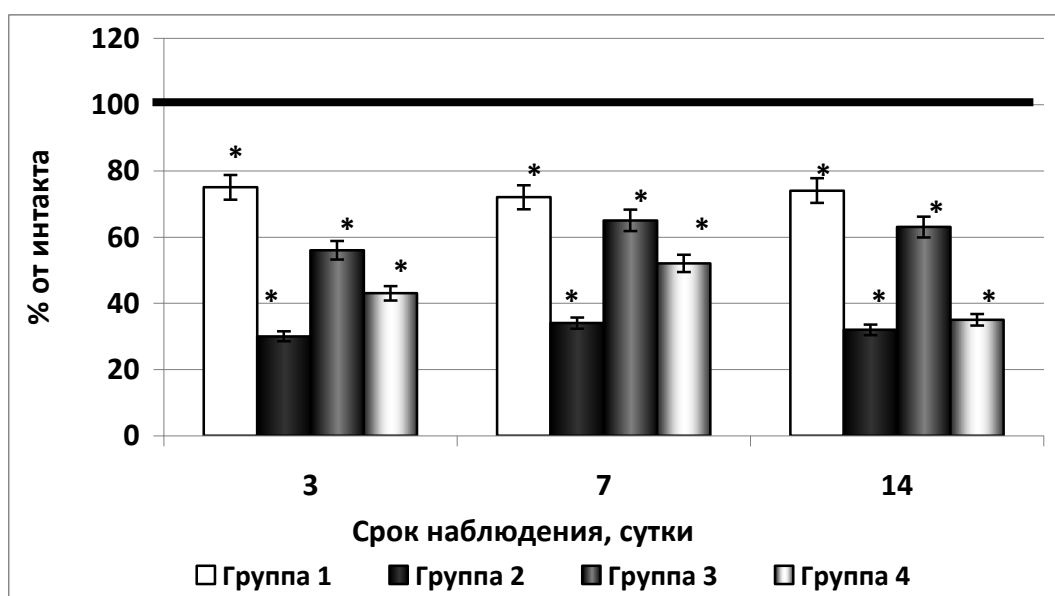


Рис. 3.5.1. Процентное содержание общих Т-лимфоцитов ($CD3^+$) в крови кроликов с экспериментальной ЛНР до и после лечения.

Показатели Т-регуляторных клеток имели аналогичную тенденцию. Содержание Т-хелперов ($CD4^+$) в крови кроликов с экспериментальной ЛНР значительно снижалось в 1-е сутки и незначительно повышалось на 7-е сутки, оставаясь на 14-е сутки значительно ниже контроля ($p < 0,05$) (табл. 3.5.2; рис. 3.5.2).

Таблица 3.5.2

Концентрация Т-хелперов ($CD4^+$) в крови кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы до и после лечения

Группа животных	Сутки после лечения		
	3	7	14
1	11,3±1,3	10,4±1,0	12,3±1,3
2	5,2±1,2	6,1±1,1	6,8±0,9
3	9,2±2,2	7,2±2,2	11,4±1,4
4	5,4±0,4	6,0±1,0	7,4±1,2
5	16,2±1,7	16,1±1,7	16,2±1,7

Примечание: различия значимы по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$).

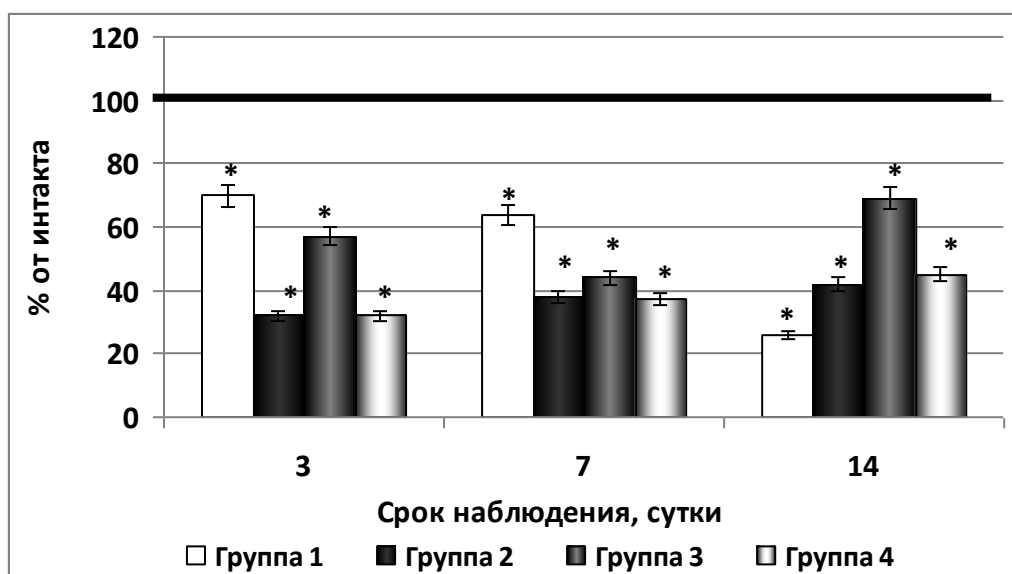


Рис. 3.5.2. Процентное содержание Т-хелперов ($CD4^+$) в крови кроликов с экспериментальной ЛНР и после лечения (* – $p < 0,05$).

При развитии воспалительного процесса в первые 7 суток после ЛНР отмечалось стойкое угнетение Т-супрессоров/цитотоксических ($CD8^+$), активация лимфоцитов не наблюдалась и на 14-е сутки (табл. 3.5.3; рис. 3.5.3).

Таблица 3.5.3

Концентрация Т-супрессоров/цитотоксических ($CD8^+$) в крови кроликов с экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы до и после лечения

Группа животных	Сутки после лечения		
	3	7	14
1	5,6±0,8	6,5±0,5	6,9±0,9
2	2,15±0,1	2,6±0,2	3,4±0,2
3	5,0±0,5	4,6±0,3	5,2±0,2
4	2,4±0,4	2,8±0,2	3,7±0,7
5	8,6±0,8	8,4±0,7	8,8±0,8

Примечание: различия значимы по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$).

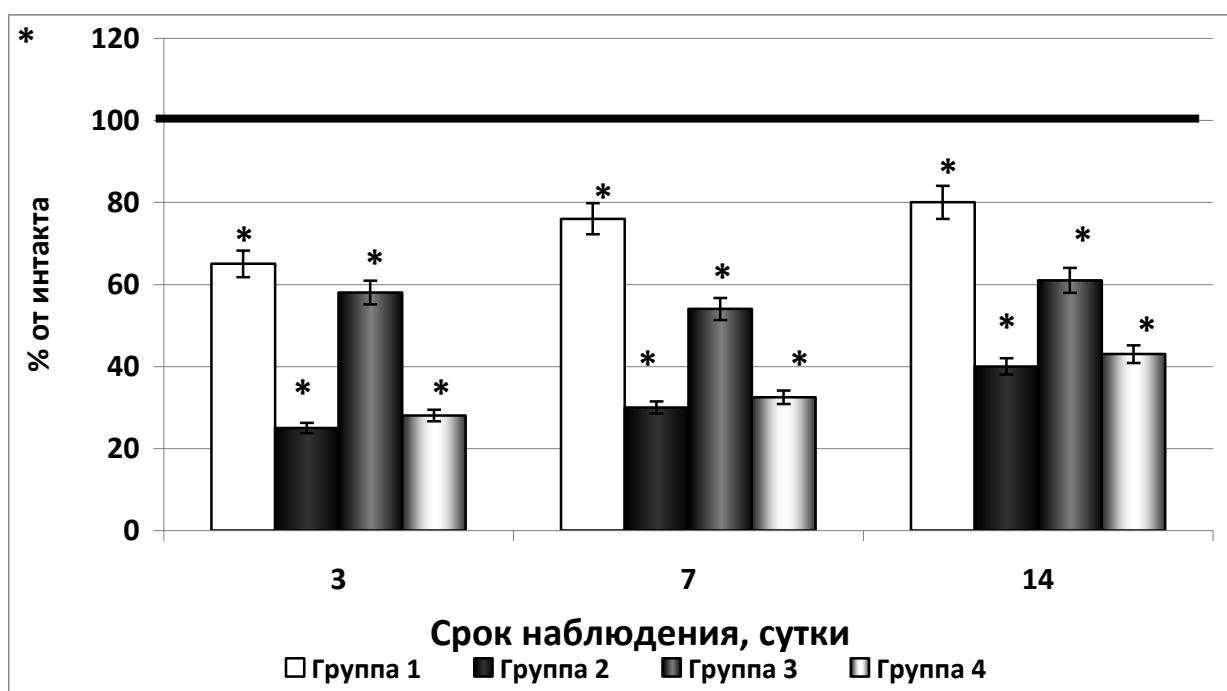


Рис. 3.5.3. Процентное содержание Т-супрессоров/цитотоксических ($CD8^+$) в крови кроликов с экспериментальной ЛНР и после лечения.

Субпопуляции регуляторных Т-хелперов ($CD4^+$) и Т-супрессоров/цитотоксических ($CD8^+$), являясь составным компонентом общей фракции Т-лимфоцитов, изменялись по мере развития ЛНР. Это нашло отражение в резком увеличении ИРИ, который уже на 3-и сутки значимо ($p < 0,05$) превышал контроль и был повышенным на 7-е сутки. Иммунорегуляторный индекс не восстанавливался до значений нормы на 14-е сутки (табл. 3.5.4; рис. 3.5.4). Такое отклонение данного показателя от значений контроля свидетельствует о выраженном дисрегуляторном состоянии при ЛНР тех клеток иммунной системы, которые определяют реализацию иммуновоспалительного процесса.

Таблица 3.5.4

Показатели иммуннорегуляторного индекса (CD4/CD8) крови кроликов с экспериментальной ЛНР до и после лечения

Группа животных	Сутки после лечения		
	3	7	14
1	2,02±0,16	1,6±0,5	1,8±0,2
2	2,4±1,1	2,35±1,0	2,0±0,5
3	1,8±0,4	1,56±1,2	2,2±0,7
4	2,25±1,0	2,1±0,5	2,0±0,2
5	1,9±0,2	1,8±0,1	2,0±0,2

Примечание: различия значимы по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$).

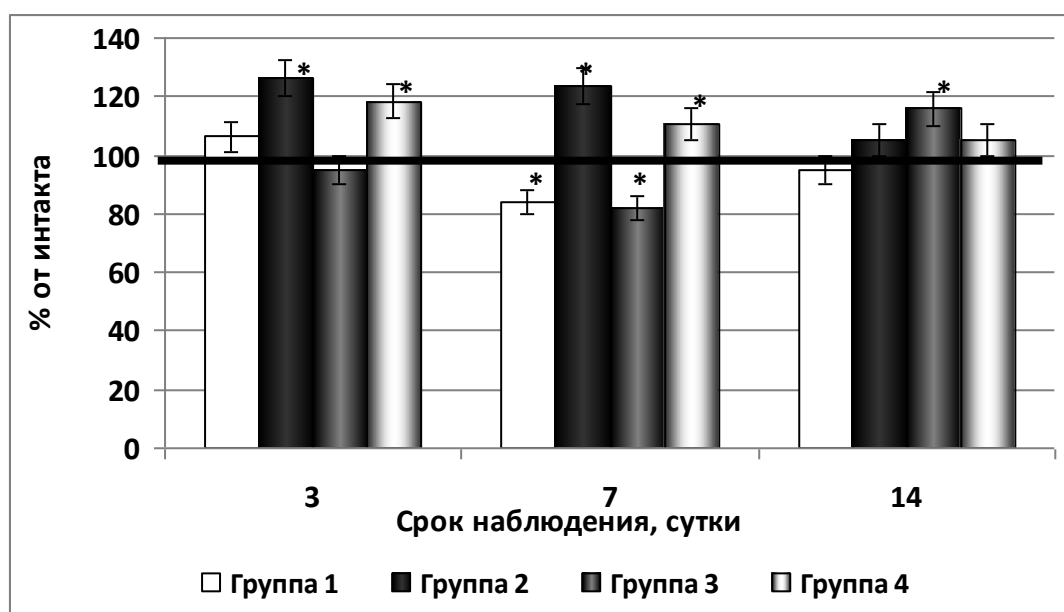


Рис. 3.5.4. Показатели ИРИ (CD4/CD8) крови кроликов с ЛНР до и после лечения (* – $p < 0,05$).

В результате лечения ЛНР у животных группы 1 введением кЯКККЧ: улучшились показатели общих Т-лимфоцитов, субпопуляции регуляторных Т-хелперов и Т-супрессоров/цитотоксических. Важно, что у

животных данной группы ИРИ наиболее приблизились к контрольным значениям во все сроки наблюдения. В группе животных, которым применяли для лечения разрушенные кЯКККЧ, такого эффекта не наблюдали (табл. 3.5.4; рис. 3.5.4).

Проведенное исследование иммунной системы показало наличие выраженных нарушений у кроликов при ЛНР. С 1-х суток у этих животных развивается транзиторная иммунологическая недостаточность, выражающаяся в снижении общего количества Т-лимфоцитов, регуляторных Т-хелперов и Т-супрессоров/цитотоксических, которая сохранялась и до 14-х суток исследования. Описанные закономерности возникновения изменений иммунной системы характерны для развития ЛНР. Однако индивидуальная иммунореактивность организма экспериментальных животных определяет различия течения патологического процесса. Проанализировав результаты исследования Т-клеточного иммунитета и приняв во внимание клинические особенности течения процесса, нами были выявлены определенные коррелятивные связи между степенью угнетения иммунной системы и развитием осложнений. Нормализация иммунных показателей коррелировала с динамикой течения ЛНР, интенсивностью рубцевания пораженных тканей переднего отдела глазного яблока, возникновением симблефаронов, помутнением оптических сред глаза. У кроликов группы 2 или группы 4 отмечалось более выраженное снижение показателей Т-клеточного иммунитета. Показатели не соответствовали норме и на 14-е сутки после развития экспериментальных ЛНР, даже позже нормализации клинического состояния. Проведенные исследования иммунологических показателей у животных с ЛНР выявили, что уже в 1-е сутки после развития патологии возникает выраженная иммуносупрессия, которая приводит к более тяжелому течению ЛНР и имеет типичные признаки вторичного иммунодефицита: нарастающая лимфоцитопения, значительное снижение количества Т-лимфоцитов на 3-и сутки. В этот

период наблюдались «всплеск» воспалительной реакции, возникновение различные осложнения (эрозии и язвы роговицы), выраженное снижение митотической активности переднего эпителия роговицы. Введение кЯКККЧ животным группы 1 способствовало нормализации этих показателей, улучшению течения паталогического процесса и его исхода. Вероятно, что механизм действия кЯКККЧ основан на их высокой иммуностропной активности, которая обеспечивает уменьшение проявлений реакции тканей глаза на Т-антиген. Проведенные иммунологические исследования позволили рекомендовать для лечения ЛНР в качестве иммуномодулятора препарат кЯКККЧ. Благодаря наличию в кЯКККЧ комплекса биологически активных веществ и клеточных элементов, ее введение способствует коррекции показателей Т-клеточного звена иммунной системы, которые развиваются при ЛНР как в глазу, так и организме в целом.

По результатам данного раздела было опубликовано:

Свидко Е.Н. Состояние Т-клеточного иммунитета у кроликов с индукцией лимбальной недостаточности роговицы / [Свидко Е.Н., Останков М.В., Дубрава Т.Г., Бондарович Н.А., Демин Ю.А.] // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2014. – Т. 65, №4. – С. 79–85.

3.6. Исследование ИФН- α и ИФН- γ в слезной жидкости и крови животных

В последние годы в литературе появились сообщения об участии в раневом процессе цитокинов, которые являются посредниками межклеточных взаимодействий, регулирующих иммунный ответ, клеточный цикл в ранах тканях, участвуют во многих физиологических и патологических процессах. К ним относят гемопозитические факторы роста,

интерфероны, лимфокины, монокины, хемокины и др. [65, 86, 137, 151, 180].

Цитокины продуцируются различными клетками: эндотелиоцитами, кератиноцитами, фибробластами, макрофагами, нейтрофилами, лимфоцитами, тромбоцитами, стромальными и другими клетками, действие которых реализуется по сетевому принципу, т. е. передаваемая клеткой информация содержится не в индивидуальном пептиде, а в наборе регуляторных цитокинов. При этом цитокины действуют либо как синергисты, либо как антагонисты, каскадно индуцируют выработку друг друга, трансмодулируют поверхностные рецепторы к другим медиаторам [150, 172].

Стимулирующее или ингибирующее действие цитокинов осуществляется посредством большого количества рецепторов на поверхности клеток. Одни и те же цитокины могут выполнять различные функции. Этот феномен объясняется нейротропностью и полифункциональностью действия цитокинов, а также множеством клеток-мишеней, на которые они действуют. Показано также, что различные цитокины могут выполнять одну функцию [38].

В работах [27, 28] предполагают, что влияние комплекса цитокинов на репаративные процессы обусловлено торможением воспалительных процессов за счет угнетения миграции клеток, участвующих в воспалительных реакциях, к очагу повреждения из зоны лимба, а также повышения пролиферативной активности фибро- и кератобластов.

В работе [162] было показано, что активация рецепторов при повреждении эпителия приводит к усиленной выработке провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, ИЛ-8, фактора некроза опухоли α . Этот цитокиновый комплекс играет большую роль в развитии воспалительной реакции и процессах заживления раны. Увеличением количества повреждений органа зрения обусловлен поиск новых средств и способов лечения глаза с учетом патогенеза раневого процесса [157].

Трансплантация фетальных клеток, культуры эпителия стромальных и эндотелиальных клеток, выращенных из ткани роговицы 14–22-недельных эмбрионов человека, на роговицу с помощью контактной линзы, инсталляции или инъекции под конъюнктив глаза при эрозиях роговицы, ожогах конъюнктивы с некрозом, язвах роговицы различного генеза, эпителиально-эндотелиальной дистрофии роговицы способствовала ускорению эпителизации роговичного дефекта, восстановлению кровотока конъюнктивы при ее ожогах, уменьшению отека роговицы [250]. Положительный лечебный эффект в плане ускорения регенерации отмечен и при сочетаном введении фетальных клеток [58]. В последние годы появились сообщения об влиянии на заживление ран различных факторов роста и стимуляцию регенерации эпителия цитокинов, в частности интерферона [171]. Сведения об изучении интерферонового статуса у пациентов с ЛНР в литературе отсутствуют, но, учитывая важную роль цитокинов, к которым относят и ИФН, в процессах воспаления, регенерации и развития иммунного ответа, было изучено состояние интерферонового статуса у кроликов с экспериментальной ЛНР.

Поскольку ответом на развитие ЛНР является изменение состояния местного и общего иммунитета, важно было исследовать показатели ИФН- α и ИФН- γ в сыворотке крови и слезной жидкости при ЛНР, а также разработать способ лечения с применением кЯКККЧ.

В результате проведенных исследований было показано, что в слезной жидкости здоровых животных в незначительном количестве присутствовали ИФН- α и ИФН- γ . При этом содержание ИФН- γ в слезной жидкости здоровых животных было выше, чем содержание ИФН- α , в отличие от сыворотки крови (табл. 3.6.1–3.6.4). При ЛНР уровень ИФН- α в крови был ниже уровня в контрольной группе в 2,3 раза, а в слезной жидкости – в два раза. В отличие от крови показатели ИФН- γ в слезе у животных с ЛНР были выше, чем ИФН- α . Наблюдения в динамике показали, что на фоне проводимой терапии уже к 7-м суткам показатели

ИФН- α у всех животных группы 1 как в сыворотке крови, так и в слезной жидкости, практически, достигали уровня контрольной группы (табл. 3.6.1, 3.6.2; рис. 3.6.1, 3.6.2).

Таблица 3.6.1

Концентрация цитокина ИФН- α в слезной жидкости кроликов с лимбальной недостаточностью роговицы и после лечения (пкг/мл)

Группы животных	Срок наблюдения, сутки			
	2	3	7	14
1	162,2 $\pm$ 3,2	143,7 $\pm$ 4,0	120,6 $\pm$ 2,6	118,6 $\pm$ 2,1
2	178,2 $\pm$ 2,2	172,3 $\pm$ 1,3	140,6 $\pm$ 1,6	122,0 $\pm$ 4,0
3	164,4 $\pm$ 4,4	149,6 $\pm$ 2,6	122,4 $\pm$ 2,4	120,2 $\pm$ 2,4
4	174,0 $\pm$ 6,0	170,0 $\pm$ 2,0	138,4 $\pm$ 2,4	122,2 $\pm$ 2,2
5	119,2 $\pm$ 1,2			

Примечание: различия значимы по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$).

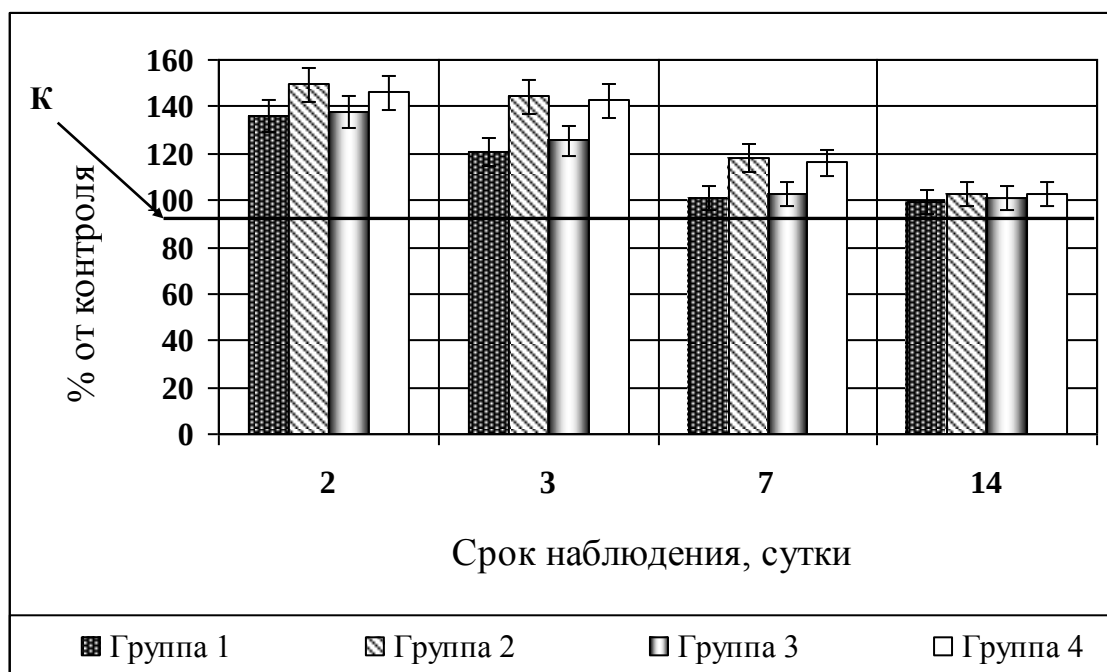


Рис. 3.6.1. Концентрация ИФН- α в слезной жидкости кроликов с ЛНР и после лечения.

Таблица 3.6.2

Концентрация цитокина ИНФ- α в крови кроликов с лимбальной недостаточностью роговицы и после лечения (пкг/мл)

Группы животных	Срок наблюдения, сутки			
	2	3	7	14
1	16,5 $\pm$ 2,5	19,2 $\pm$ 6,0	35,9 $\pm$ 5,0	39,9 $\pm$ 6,0
2	13,7 $\pm$ 2,0	12,2 $\pm$ 2,2	18,0 $\pm$ 2,0	26,8 $\pm$ 5,8
3	14,9 $\pm$ 5,7	18,5 $\pm$ 4,0	34,2 $\pm$ 2,0	38,0 $\pm$ 6,0
4	14,0 $\pm$ 6,0	13,1 $\pm$ 5,1	18,8 $\pm$ 2,2	27,5 $\pm$ 5,5
5	45,5 $\pm$ 2,5			

Примечание: различия значимы по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$).

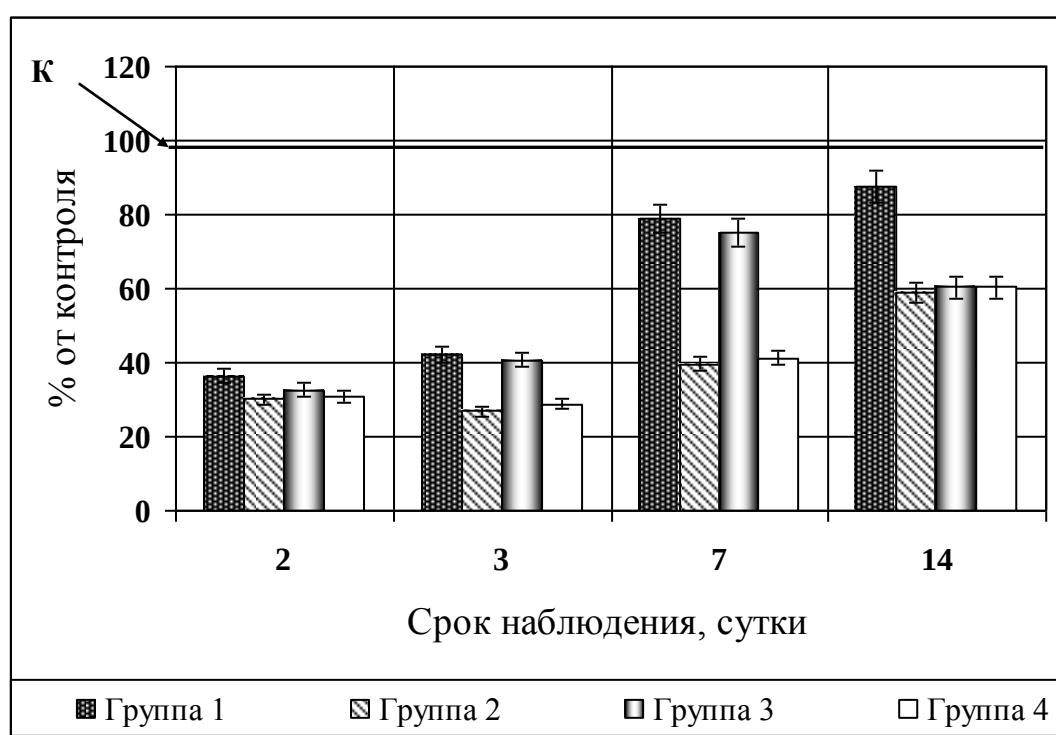


Рис. 3.6.2. Концентрация ИФН- α в сыворотке крови кроликов с ЛНР и после лечения.

У кроликов группы 3, которым вводили разрушенные клетки кЯКККЧ, на 7-е сутки наблюдали увеличение содержания ИФН- α , которое

было выше, чем у животных группы 1. Однако на 14-е сутки этот показатель был значимо выше, чем в группе 4 ($p > 0,05$).

У кроликов группы 4, которым вводили физраствор по сравнению с контролем выработка ИНФ- α как в слезной жидкости, так и в сыворотке крови до 14-х суток была снижена.

При исследовании активности ИНФ- γ в слезной жидкости и в сыворотке крови было показано, что у животных группы 1 она также значимо повышалась на 7-е сутки и восстанавливалась до уровня контрольной группы на 14-е сутки (табл. 3.6.3, 3.6.4; рис. 3.6.3, 3.6.4).

Таблица 3.6.3

Концентрация цитокина ИНФ- γ в слезной жидкости кроликов с лимбальной недостаточностью роговицы и после лечения (пкг/мл)

Группы животных	Срок наблюдения, сутки			
	2	3	7	14
1	84,2 $\pm$ 2,2	72,2 $\pm$ 3,2	52,0 $\pm$ 2,0	50,8 $\pm$ 0,8
2	90,6 $\pm$ 5,6	98,4 $\pm$ 2,4	96,0 $\pm$ 4,0	62,4 $\pm$ 2,4
3	86,0 $\pm$ 2,0	78,0 $\pm$ 5,0	54,5 $\pm$ 2,5	51,0 $\pm$ 1,0
4	88,2 $\pm$ 2,2	92,0 $\pm$ 2,0	94,0 $\pm$ 4,0	56,8 $\pm$ 2,2
5	50,0 $\pm$ 0,8			

Примечание: различия значимы по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$).

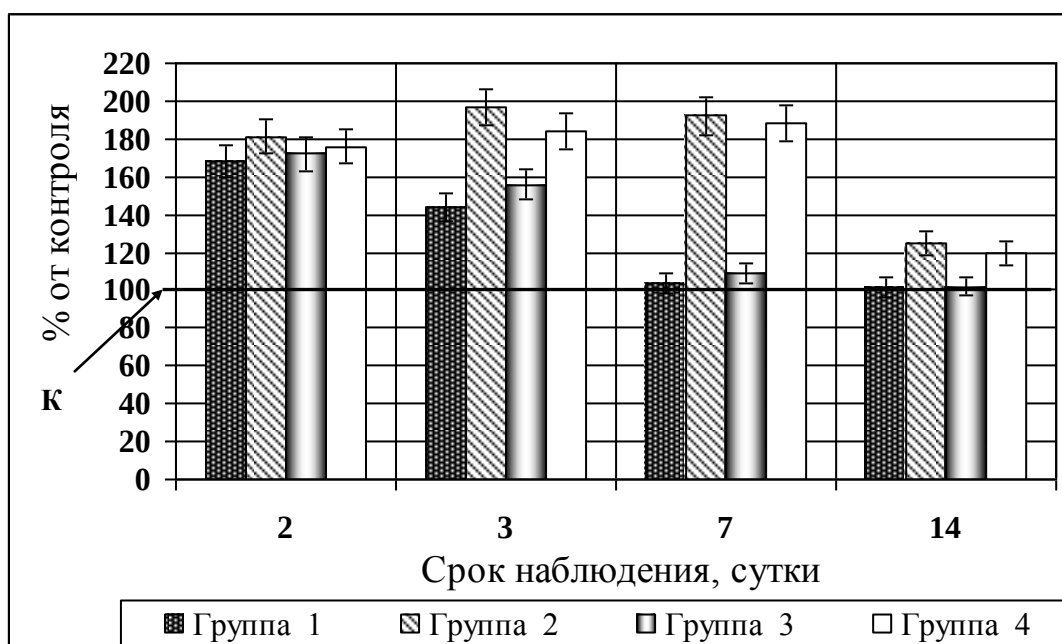


Рис. 3.6.3. Показатели концентрации ИФН- γ в слезной жидкости кроликов с лимбальной недостаточностью роговицы и после лечения.

Таблица 3.6.4

Концентрации цитокина ИФН- γ в крови кроликов с лимбальной недостаточностью роговицы до и после лечения (пкг/мл)

Группы животных	Срок наблюдения, сутки			
	2	3	7	14
1	22,0 $\pm$ 2,0	24,5 $\pm$ 1,5	29,0 $\pm$ 2,0	32,0 $\pm$ 2,0
2	13,7 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 1,0	13,8 $\pm$ 3,2	20,5 $\pm$ 2,5
3	18,7 $\pm$ 2,7	22,0 $\pm$ 2,0	24,6 $\pm$ 2,6	29,2 $\pm$ 2,2
4	17,6 $\pm$ 2,1	16,8 $\pm$ 0,8	15,4 $\pm$ 4,4	21,9 $\pm$ 0,9
5	32,5 $\pm$ 3,5			

Примечание: различия значимы по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$).

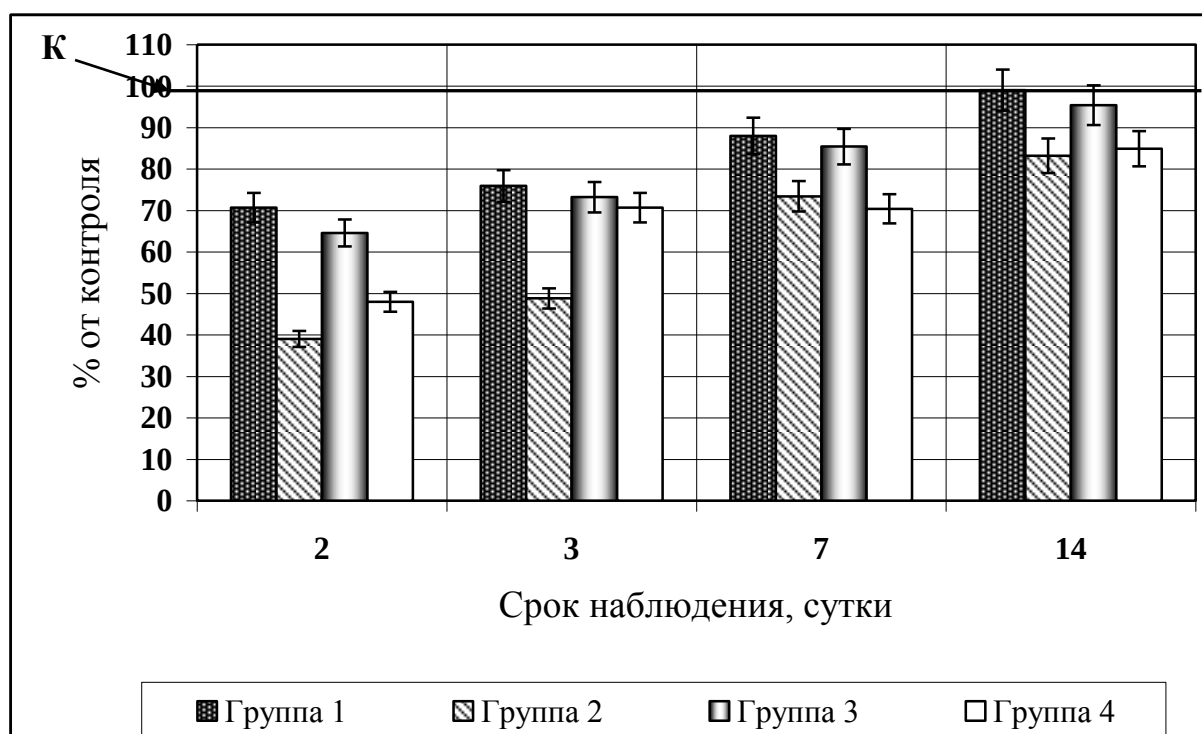


Рис. 3.6.4. Показатели концентрации ИФН- γ в сыворотке крови кроликов с лимбальной недостаточностью роговицы и после лечения.

Значимых различий в содержании ИФН- α и ИФН- γ в слезной жидкости и сыворотке крови кроликов группы 1 на 14-е сутки выявлено не было по сравнению с контрольной группой (табл. 3.6.1–3.6.4; рис. 3.6.1–3.6.4).

Снижение активности ИФН не может не отразиться на развитии ответной реакции на травму и клинических проявлениях развития воспалительных реакций, поскольку показано, что она находится в тесной связи с иммунной системой. Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности ИФН- α и ИФН- γ в цельной крови и повышении в слезной жидкости у животных с ЛНР. Главной функцией иммунной системы является контроль за белковым постоянством многоклеточных популяций организма, а система ИФН играет главную роль в надзоре за генетическим постоянством организма. В связи с этим иммунная система имеет специализированные клетки и органы; для нее характерна специфичность реагирования на чужеродный агент. Система ИФН,

напротив, распределена практически по всем клеткам организма и обладает лишь относительной видовой специфичностью. Показано, что при физиологическом состоянии спектр их действия ограничен, но при стрессе, воспалении, повреждении и других патологических состояниях расширяется количественный и качественный состав цитокинов, обладающих как местной, так и дистантной (гормональной) активностью. Механизмы иммуномодулирующих эффектов ИФН связаны с их действием на рецепторный аппарат клетки, внутриклеточные процессы и, как следствие, на отдельные функции иммунокомпетентных и воспалительных клеток (пролиферацию, дифференцировку, миграцию и др.). Выявленное нами снижение активности ИФН нуждается в коррекции и делает обоснованным использование кЯКККЧ или нежизнеспособных клеток при лечении поврежденной роговицы.

По результатам данного раздела было опубликовано работа:

Свидко Е.Н. Интерфероновый статус и эффективность применения криоконсервированной кордовой крови в лечении повреждения роговицы / [Свидко Е.Н., Борисов П.А., Останков М.В., Бондарович Н.А., Демин Ю.А.] // Медицина сегодня и завтра. – 2014. – Вып. 4. – С. 24–30.

3.7. Характеристика структуры роговицы интактного кролика при экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы и после лечения

3.7.1. Особенности структуры роговицы глаза интактного кролика. При гистологическом исследовании роговицы глаза интактного кролика было показано, что она состоит из переднего эпителия, собственного вещества (стромы), задней пограничной пластинки

(десцеметовой оболочки) и заднего эпителия. Передняя пограничная пластинка четко не выделялась (рис. 3.7.1).

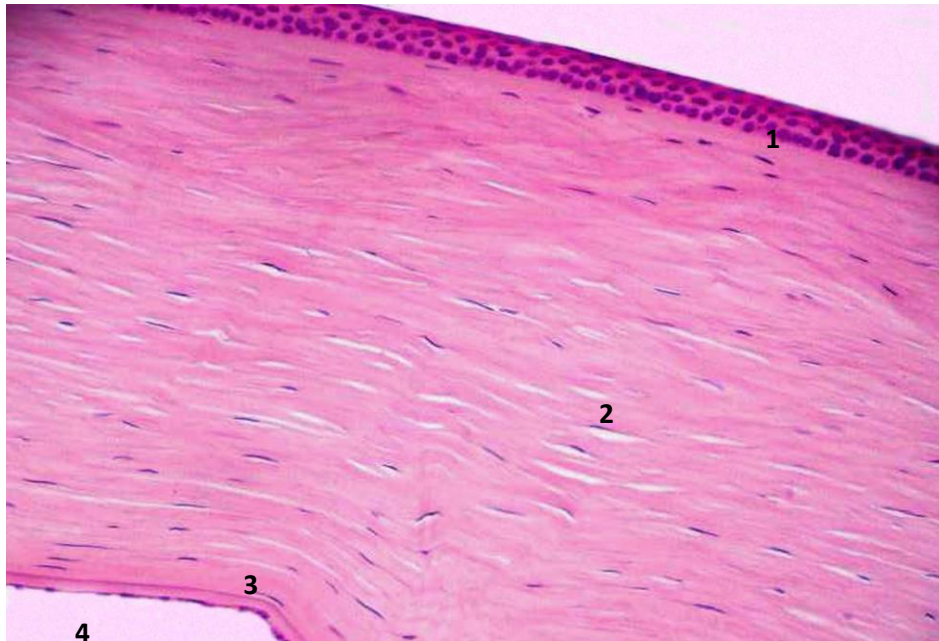


Рис. 3.7.1. Роговица глаза интактного кролика. Окраска гематоксилином и еозином: 1 – передний эпителий, 2 – собственное вещество. 3 – задняя пограничная пластинка, 4 – эндотелий; x100.

Нами было установлено, что клетки переднего эпителия плотно прилегали друг к другу и образовывали несколько слоев, которые состояли из клеток разной формы (рис. 3.7.2).

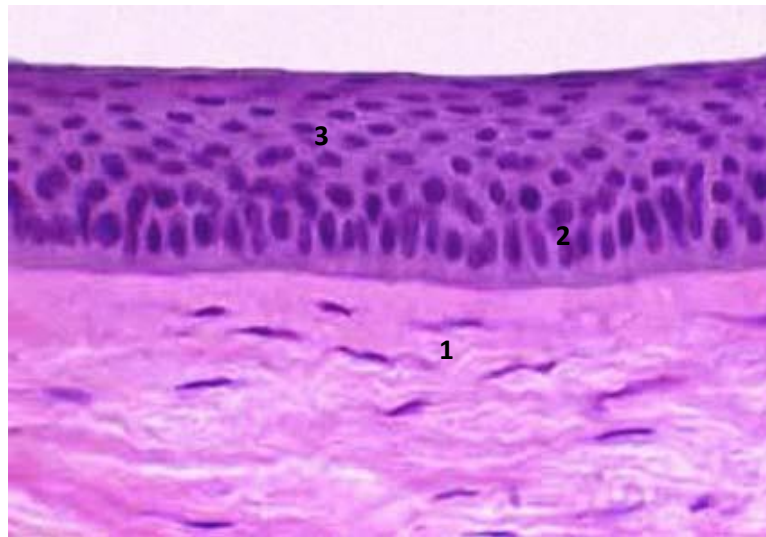


Рис. 3.7.2. Макрофотография роговицы глаза кролика. Слои эпителия. Окраска гематоксилином и еозином: 1 – базальный слой, 2 – промежуточный слой, 3 – поверхностный слой; x400.

Для клеток нижнего базального слоя характерна призматическая форма и расположение в один ряд на базальной мембране. Они имели овальные, довольно крупные ядра, расположенные ближе к верхушке клеток. К этому слою прилегали два ряда клеток многогранной формы с вытянутыми отростками, так называемые шиповатые или остистые клетки, округлые ядра которых занимали центральную часть цитоплазмы клетки. Над слоем шиповатых клеток наблюдали 5–6 рядов плоских клеток с удлинёнными ядрами, расположенными параллельно поверхности роговицы. Клетки поверхностного слоя не имели признаков ороговения.

Передний эпителий на периферии роговицы в области лимба постепенно переходил в эпителий конъюнктивы, о чем свидетельствовало появление бокаловидных клеток.

Под эпителием просматривалась строма роговицы (см. рис. 3.7.1), которая состояла из упорядоченно расположенных, параллельных ее поверхности пучков коллагеновых волокон, которые образовывали гомогенные пластинки. В пластинках и между ними выявились кератоциты

(с характерными для них базофильными ядрами) вытянутой формы, которые располагались параллельно поверхности роговицы.

В нижнем отделе строма переходила в заднюю пограничную пластинку (десцеметову оболочку), состоящую из плотнорасположенных коллагеновых волокон, погруженных в аморфное вещество.

С внутренней стороны роговицы к задней пограничной пластинке прилегал один слой плоского эндотелия с овальными ядрами, ось которых была ориентирована параллельно оси клеток роговицы.

3.7.2. Изменения структуры роговицы кролика при лимбальной недостаточности роговицы. На гистологических препаратах роговицы животных с ЛНР (группа 2) на 3-и сутки наблюдали почти полный (около 80%) дефект переднего эпителия. Эпителий тонкий, его поверхность неровная, эпителиоциты расположены в 1–2 ряда (рис. 3.7.3).

По периферии роговицы, ближе к лимбу, в переднем эпителии выявлялось больше слоев клеток, чем в центральной части. Эпителиоциты имели гиперхромные ядра неправильной формы, а также набухшую и оптически светлую цитоплазму. Клетки различных слоев морфологически отличались, поэтому невозможно было выделить слои переднего эпителия, которые четко просматривались в группе интактных животных. При подготовке гистологических препаратов эпителиальный слой роговицы легко отслаивался от базальной мембраны (рис. 3.7.3).

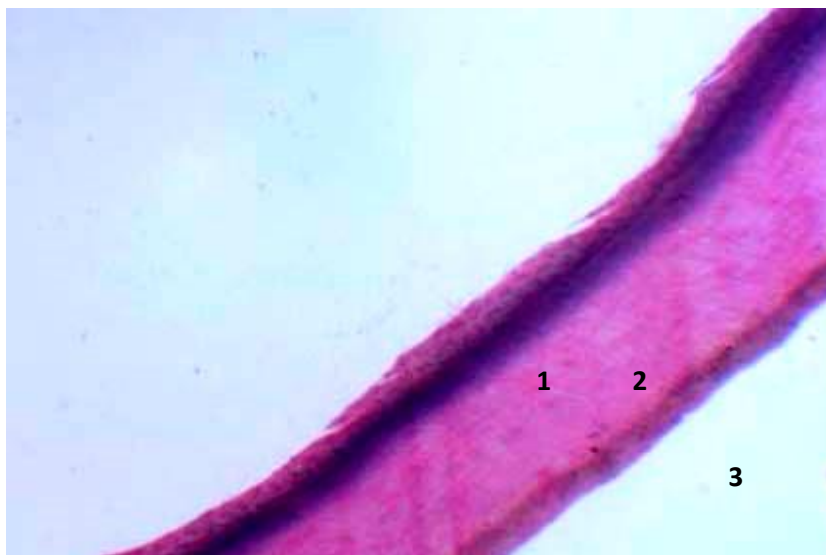


Рис. 3.7.3. Роговица интактного кролика (контрольная группа). Тонкий слой переднего эпителия. Окраска гематоксилином и еозином: 1 – передний эпителий, 2 – собственное вещество (строма), 3 – задний эпителий (эндотелий); x100.

В строме роговицы был обнаружен значительный отек, который привел к расслоению коллагеновых волокон и появлению между ними щелей. Кератоциты были вытянутой формы и имели гиперхромные ядра. Наблюдалась миграция сегментоядерных лейкоцитов, более выраженная на периферии, что свидетельствует об интенсивности течения воспалительного процесса.

С нижним краем стромы роговицы граничила десцеметова оболочка, которая была представлена слоем плотнорасположенных коллагеновых волокон.

В заднем отделе эпителия роговицы морфологически распознаваемым был один слой клеток, неправильной полигональной формы. Они имели ядра овальной формы и светлую цитоплазму. На гистологических препаратах наблюдалось значительное увеличение размеров клеток за счет отека цитоплазмы. Контур эндотелия был неровный (рис. 3.7.4).

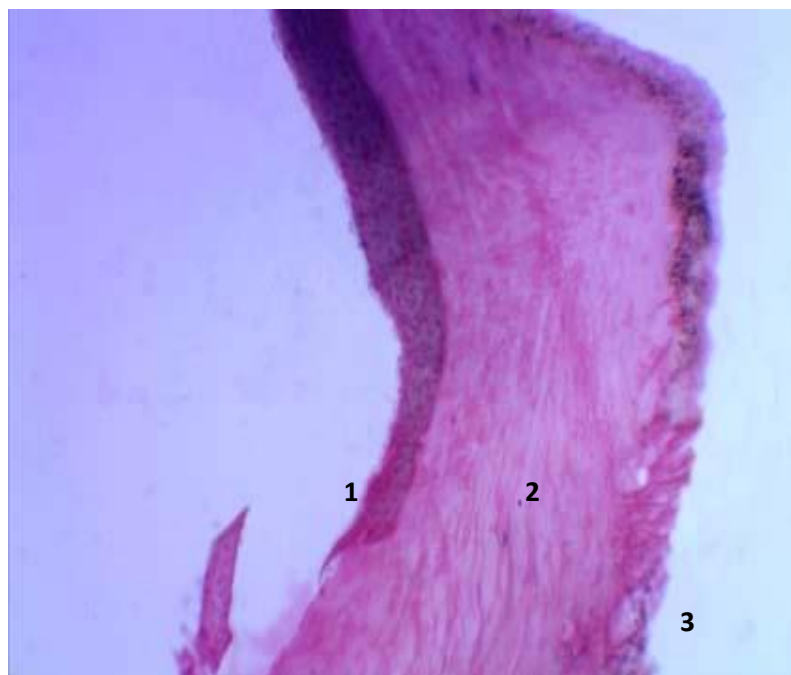


Рис. 3.7.4. Роговица интактного кролика (контрольная группа). Частичное отслоение переднего эпителия от базальной мембраны. Окраска гематоксилином и эозином: 1 – передний эпителий; 2 – строма; 3 – задний эпителий (эндотелий); x100.

На 7-е сутки исследования в роговице животных группы 2 наблюдали эпителизацию. При детальном изучении было установлено нарушение дифференцировки эпителия роговицы. Толщина переднего эпителия в ней была неравномерной: по периферии больше, чем в центре. Эпителий многослойный, но было заметно нарушение упорядоченного расположения клеток, которое характерно для переднего эпителия роговицы, появление бокаловидных клеток, встречающихся в эпителии конъюнктивы. По периферии эпителий конъюнктивы в виде вала нарастал на поверхность роговицы. Наблюдалась неровность поверхности роговицы (рис. 3.7.5).

Уменьшился отек стромы роговицы, коллагеновые волокна, которые объединены в пучки, располагались параллельно друг другу. Между ними располагались кератоциты. Клетки имели базофильные ядра, длинная ось которых была расположена параллельно поверхности роговицы.

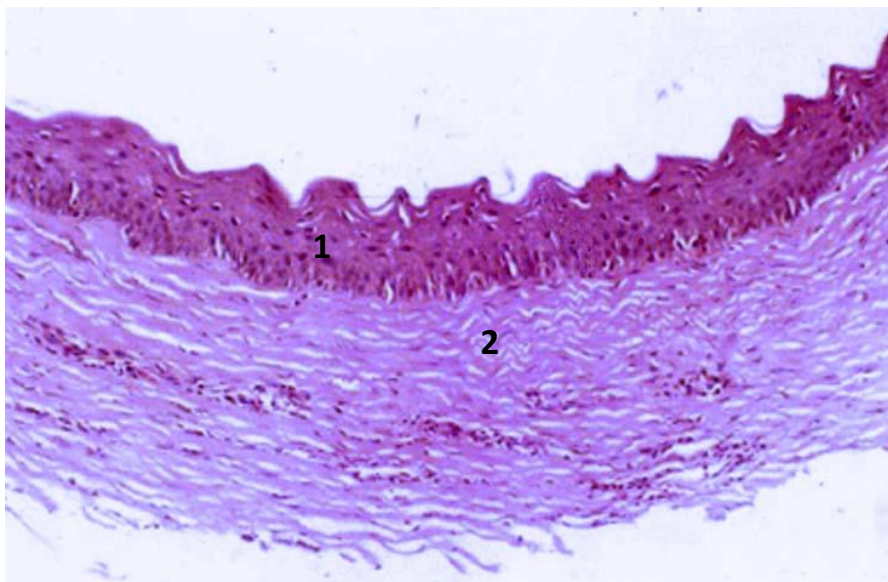


Рис. 3.7.5. Конъюнктивизация эпителия роговицы кролика (контрольная группа) на 7-е сутки наблюдения: окраска гематоксилином и эозином: 1 – передний эпителий; 2 – собственное вещество (stroma); x100.

Отмечалось значительное уменьшение количества сегментоядерных лейкоцитов в поверхностных слоях собственного вещества роговицы, что свидетельствовало о затухании воспалительного процесса.

В строме роговицы были заметны единичные сосуды (рис. 3.7.6). Эндотелиоциты имели сплюснутые базофильные ядра и слегка отёчную эозинофильную цитоплазму. Периваскулярно были заметны единичные лимфоциты.

С нижним краем стромы роговицы граничила десцеметова оболочка, которая была изменена.

Клетки заднего эпителия имели базофильные ядра овальной формы и светлую оксифильную цитоплазму. Отмечалось значительное уменьшение отека цитоплазмы, структура клеток заднего эпителия соответствовала таковым у интактных животных.

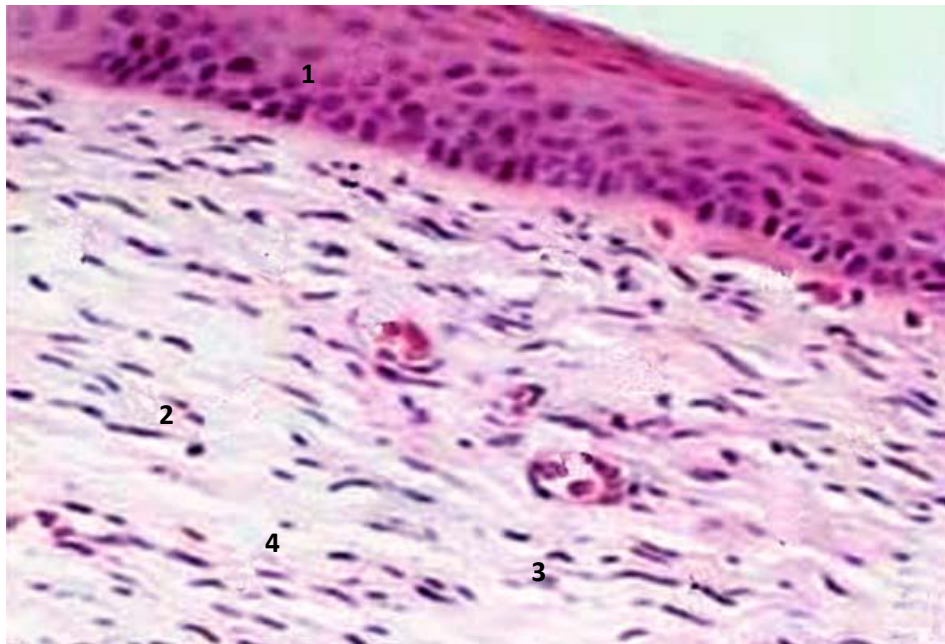


Рис. 3.7.6. Роговица кролика (группа 2) на 7-е сутки наблюдения: 1 – передний эпителий, 2 – собственная вещество, 3 – новообразованные сосуды, 4 – кератоциты. Неоваскуляризация стромы. Окраска гематоксилином и эозином; x100.

На 14-е сутки исследования в роговице животных группы 2 наблюдали полную эпителизацию. Определялся многослойный эпителий, который создавал неровную поверхность роговицы. Наблюдалось появление бокаловидных клеток, характерных для эпителия конъюнктивы, который нарастал на ее поверхность по периферии (рис. 3.7.7).

Волокнистые компоненты стромы роговицы приобретали рыхлость, что способствовало прорастанию сосудов из области лимба в парацентральную, преимущественно в переднюю треть роговицы.

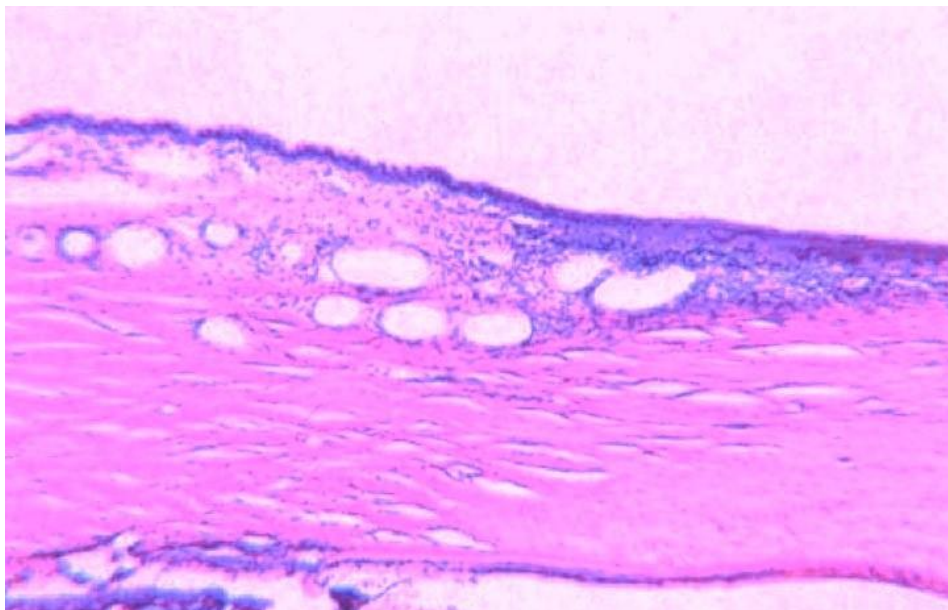


Рис. 3.7.7. Роговица кролика (контрольная группа) на 14-е сутки наблюдения. Область лимба. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$.

3.7.3. Морфологические особенности роговицы кролика с экспериментальной лимбальной недостаточностью роговицы после введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека. На гистологических препаратах роговицы животных с экспериментальной ЛНР, которым были введены кЯКККЧ (группа 1), на 3-и сутки наблюдали эпителизацию. Толщина переднего эпителия была неравномерной на всей поверхности роговицы. На периферии в местах активной пролиферации, эпителиальные клетки образовывали 5–6 слоев. Клетки базального слоя имели большое ядерно-цитоплазматическое соотношение, наблюдалось значительное количество митозов (рис. 3.7.8).

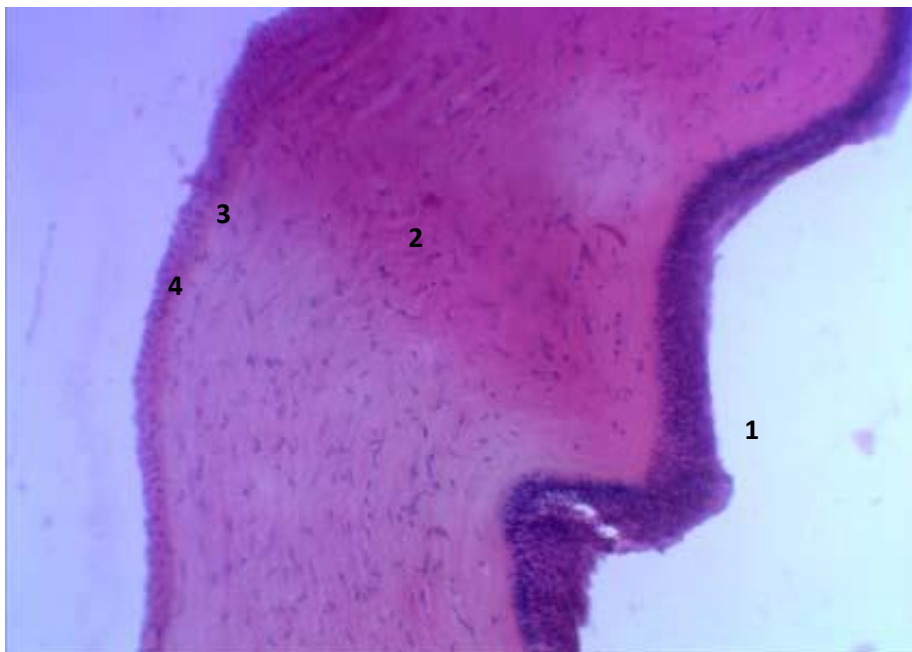


Рис. 3.7.8. Роговица кролика (группа 1) на 3-и сутки наблюдения: 1 – передний эпителий, 2 – собственная вещество, 3 – задняя пограничная пластинка, 4 – задний эпителий. Регенерация переднего эпителия по периферии роговицы. Окраска гематоксилином и еозином; x100.

Исследование гистологических препаратов роговицы глаза животных с ЛНР и введением КЯКККЧ выявило миграцию клеток от периферии к центру роговицы и замещение ими эпителиального дефекта. В области лимба было заметно место введения криоконсервированных клеток кордовой крови в виде тяжа клеток, погруженного в строму роговицы (рис. 3.7.9). Ядра клеток были неправильной или несколько вытянутой формы и занимали почти всю площадь цитоплазмы. Они хорошо окрашивались основными красителями. В части клеток заметны участки митоза. Наблюдался незначительный отек стромы вокруг места введения КЯКККЧ, воспалительной инфильтрации ткани выявлено не было.

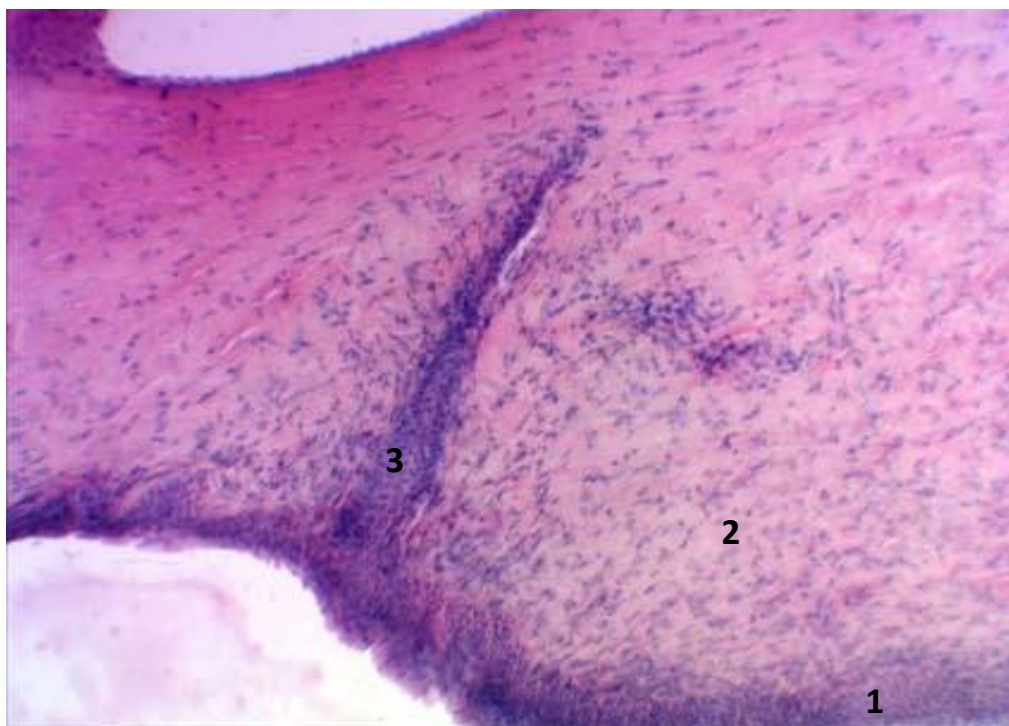


Рис. 3.7.9. Роговица кролика (опытная группа) на 3-и сутки наблюдения: 1 – передний эпителий, 2 – собственная вещество, 3 – место введения кЯКККЧ. Место введения кЯКККЧ. Окраска гематоксилином и еозином; x100.

Ближе к центральной части роговицы 2–3 слоя эпителиальных клеток. Это был дифференцированный роговичный эпителий. Клетки базального слоя призматической формы с овальными базофильными ядрами, которые просматривались в средней части каждой клетки. К базальному слою прилегал один, иногда два слоя клеток меньшего размера, многогранной формы, с округлыми базофильными ядрами (рис. 3.7.10). Базальная мембрана выглядела непрерывной с неравномерной толщиной.

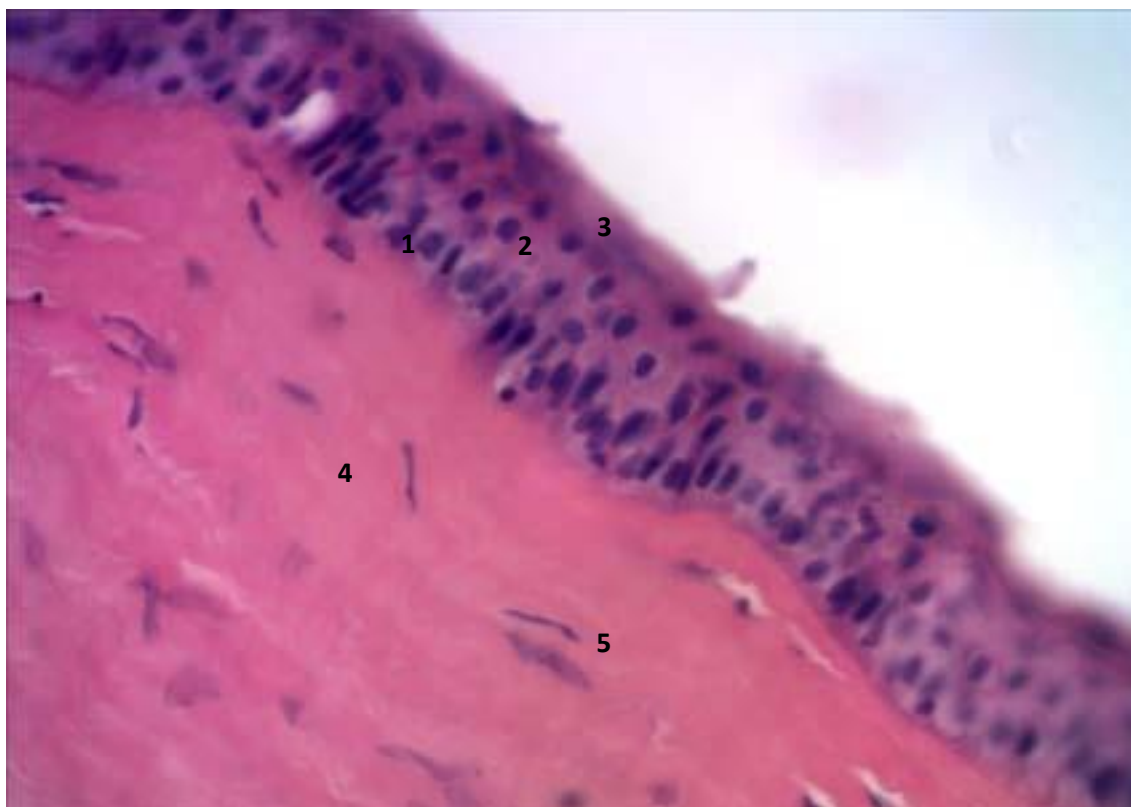


Рис. 3.7.10. Роговица кролика (опытная группа) на 3-и сутки наблюдения: 1 – базальный слой, 2 – промежуточный слой, 3 – поверхностный слой, 4 – собственная вещество, 5 – кератоциты. Регенерация переднего эпителия в центральной части роговицы. Окраска гематоксилином и эозином; x400.

В строме роговицы наблюдался незначительный отек. Пучки коллагеновых волокон были окрашены оксифильно, расположены параллельно. Кое-где между ними выявлялись щели, что свидетельствовало о незначительном отеке аморфного вещества. Между пучками коллагеновых фибрилл выявлялись клетки вытянутой формы – кератоциты, ядра которых были также вытянутой формы, ориентированные вдоль пучков коллагеновых волокон. В верхних слоях стромы встречались единичные сегментоядерные лейкоциты.

Десцеметова оболочка определялась в виде непрерывной пластинки, образованной коллагеновыми волокнами.

С внутренней стороны к ней примыкал слой плоских клеток эндотелия с овальными базофильными ядрами, ось которых была расположена параллельно поверхности роговицы. Цитоплазма этих клеток также была оксифильна, отека не наблюдалось.

На 7-е сутки наблюдения роговица глаза экспериментальных животных была покрыта дифференцированным многослойным плоским неороговевающим эпителием (рис. 3.7.11).

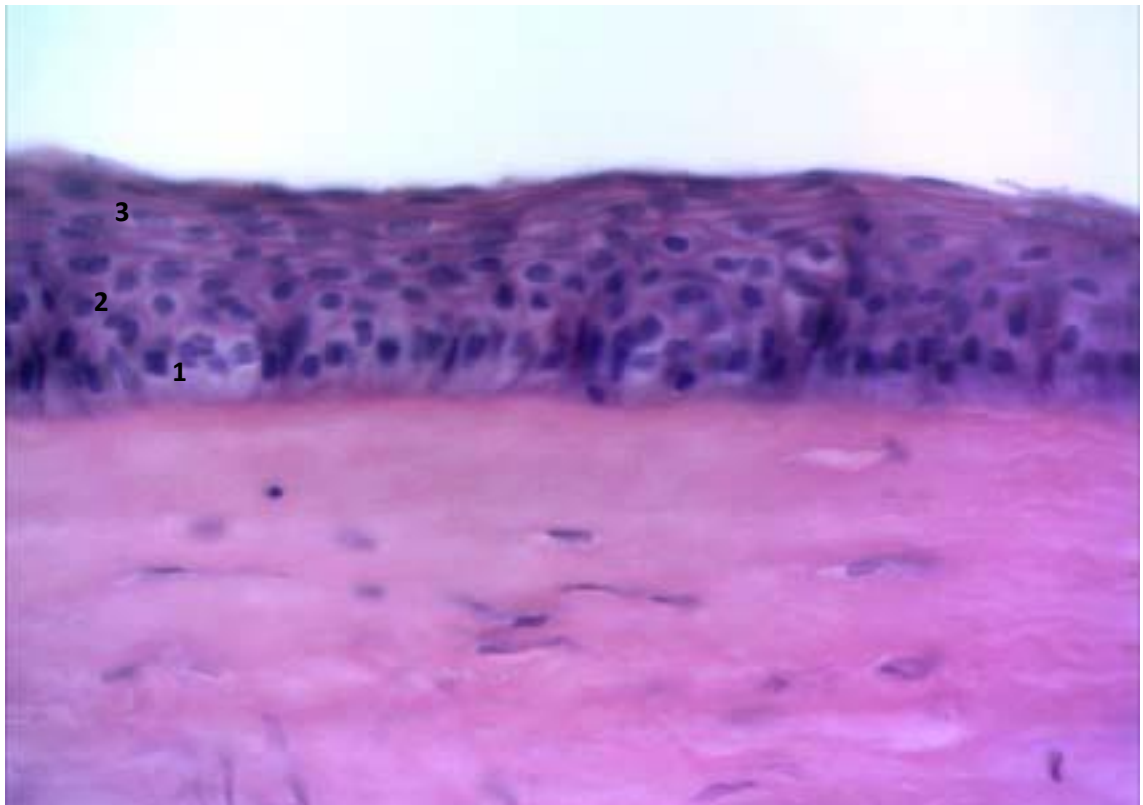


Рис. 3.7.11. Роговица кролика (группа 1) на 7-е сутки наблюдения: 1 – слой базальных клеток, 2 – слой шиповатых клеток, 3 – слой плоских клеток. Многослойный плоский неороговевающий эпителий. Окраска гематоксилином и эозином; x400.

Эпителиоциты базального слоя имели призматическую форму и располагались в один слой на базальной мембране, перпендикулярно к поверхности роговицы. Их цитоплазма светлая, ядро овальной формы расположено в средней части клетки. Над слоем базальных клеток

наблюдали 2–3 слоя шиповатых клеток с ядрами овальной формы. Клетки имели многоугольную форму, их размерам был меньше размера базальных эпителиоцитов. Над слоем шиповатых клеток обнаруживалось два ряда уплощенных клеток, которые образовывали поверхностный слой. Их удлиненные ядра были расположены параллельно поверхности роговицы.

На 7-е сутки после введения кЯКККЧ в строме наблюдались пучки коллагеновых волокон, расположенных упорядоченно, параллельно поверхности роговицы (рис. 3.7.12). Между ними определялись кератоциты, вытянутой формы, с большими слабо базофильными ядрами. Инфильтрация стромы роговицы сегментоядерными лейкоцитами не отмечалась.



Рис. 3.7.12. Роговица кролика (группа 1) на 7-е сутки наблюдения: 1 – передний эпителий, 2 – собственная вещество (stroma), 3 – задняя пограничная пластинка, 4 – задний эпителий (эндотелий). Окраска гематоксилином и эозином; x100.

В области лимба в субэпителиальных отделах роговицы наблюдались клетки с базофильными ядрами неправильной или слегка вытянутой формы, которые занимали большую часть цитоплазмы (рис. 3.7.13). Некоторые из этих клеток имели гиперхромные ядра, заметны отдельные фигуры митоза.

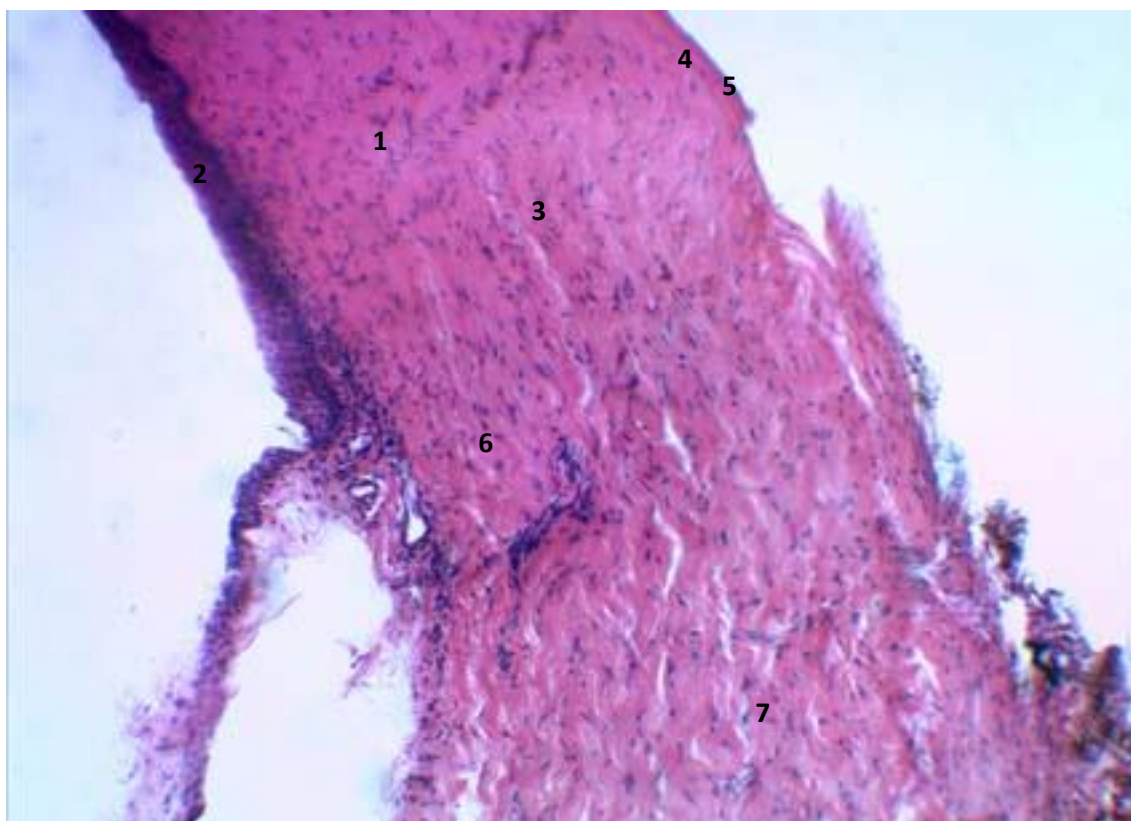


Рис. 3.7.13. Роговица кролика (группа 1) на 7-е сутки наблюдения: 1 – роговица, 2 – передний эпителий роговицы, 3 – собственная вещество (строма), 4 – задняя пограничная пластинка, 5 – задний эпителий (эндотелий), 6 – лимб, 7 – склера. Лимб роговицы. Окраска гематоксилином и эозином; x200.

На 7-е сутки в поверхностной области собственного вещества роговицы были заметны сосуды с тонкой стенкой. Клетки эндотелия были вытянутой формы и имели измененные слабобазофильные ядра.

Периваскулярно наблюдались коллагеновые волокна, единичные лимфоциты, макрофаги.

В области лимба строма роговицы была образована упорядоченно расположенными тонкими пластинками коллагеновых волокон, погруженными в аморфное вещество. Собственное вещество роговицы под острым углом переходило в склеру, содержащую пучки коллагеновых волокон, между которыми находились фибробласты. В нижней трети перехода роговицы в склеру наблюдался венозный синус склеры, стенку которого покрывал один слой плоских эндотелиоцитов. Просвет его был неправильной формы.

С нижним слоем собственного вещества роговицы граничила десцеметовая оболочка, которая была образована коллагеновыми волокнами. Возле лимба она истончалась и переходила в трабекулы склеры.

Задний эпителий роговицы был образован одним слоем плоских клеток с овальными базофильными ядрами. В области лимба он переходил на трабекулярные волокна.

На 14-е сутки отмечали эпителизацию роговицы, представленную 2–3 слоями эпителиоцитов. По сравнению с 7 сутками наблюдения отмечали значительно увеличилось количество фибробластов на единицу площади в центральной оптической области роговицы, что свидетельствовало об усилении пролиферативной активности.

Эндотелий роговицы на 14-е сутки был образован одним слоем плоских клеток с овальными базофильными ядрами и имел ровный контур (рис. 3.7.14).

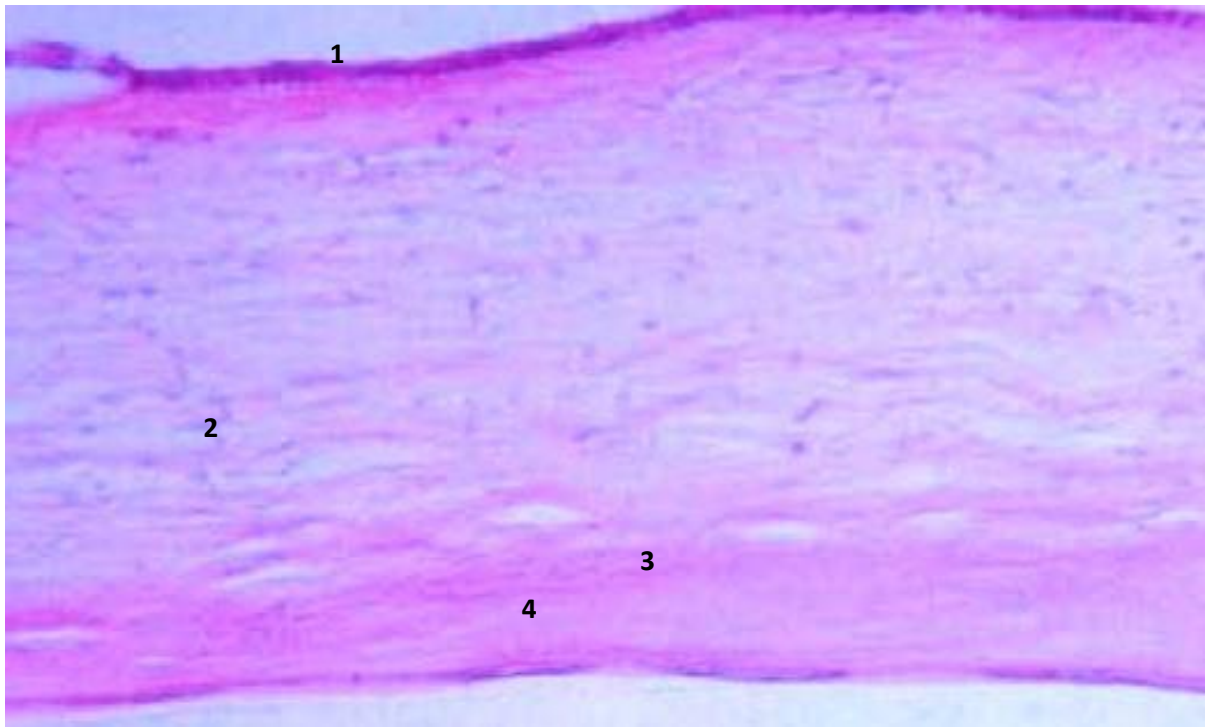


Рис. 3.7.14. Роговица кролика (опытная группа) на 14-е сутки наблюдения: 1 – передний эпителий, 2 – собственная вещество (строма), 3 – задняя пограничная пластинка, 4 – задний эпителий (эндотелий). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 100$.

Таким образом, проведенное морфологическое исследование ткани роговицы глаз кроликов показало, что введение кЯКККЧ животным с ЛНР способствовало ускорению регенеративных процессов. Отмечено полное восстановление переднего эпителия роговицы на 14-е сутки, которое происходило за счет миграции и дифференцировки введенных кЯКККЧ, а также возможной стимуляции ими собственных лимбальных СК.

По результатам данного раздела была опубликована работа:

Свідко К.М.. Морфологічні особливості репаративних процесів у рогівці кролів при введенні кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові на тлі експериментальної лімбальної недостатності / [Свідко К.М., Дьомін Ю.А.]// Світ медицини та біології. – 2013. – Вып. 3. – С. 41–44.

3.8. Клиническое течение репаративных процессов в глазу экспериментальных животных

При клиническом исследовании переднего отдела глаза кроликов каких-либо признаков специфической токсикоаллергической реакции на введение суспензии кЯКККЧ (дерматит век, хемоз, аллергические инфильтраты в лимбе и перилимбально или на роговице) выявлено не было. На 3-и сутки на роговице кроликов групп 1–4 наблюдали одинаковую воспалительную реакцию, оцененную в 2 балла. Визуально отмечали слизистое отделяемое, смешанную инъекцию конъюнктивы, перифокальный отек роговицы (табл. 3.8.1; рис. 3.8.1–3.8.3).

Диаметр эпителиального дефекта в этих группах был одинаковым и составлял в среднем 6 мм.



Рис. 3.8.1. Фотография роговицы кролика группы 2 на 3-и сутки после введения кЯКККЧ. Оценка воспалительной реакции – 2 балла.



Рис. 3.8.2. Фотография роговицы кролика группы 3 на 3-и сутки после введения кЯКККЧ. Оценка воспалительной реакции – 2 балла.

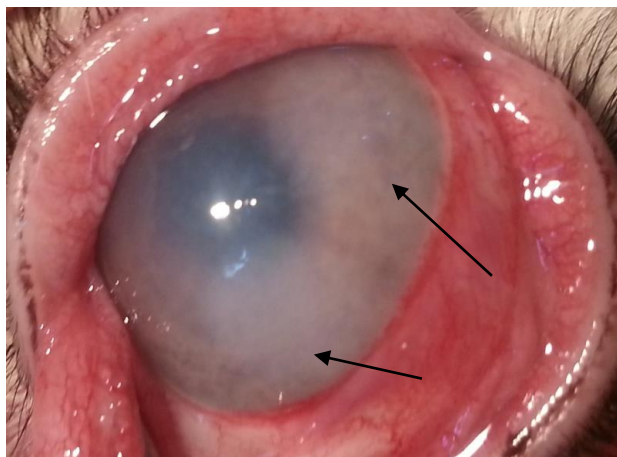


Рис. 3.8.3. Фотография роговицы кролика группы 4 на 3-и сутки после введения кЯКККЧ. Оценка воспалительной реакции – 2 балла. Место введения физиологического раствора показано стрелками.

На 3–4-е сутки после введения кЯКККЧ у животных группы 5 роговица глаза сохраняла прозрачность, воспалительная реакция не наблюдалась (рис. 3.8.4).



Рис. 3.8.4. Фотография роговицы кролика группы 5 на 3-и сутки после введения кЯКККЧ. Оценка воспалительной реакции – 0 баллов.

Таблица 3.8.1

Оценка клинических характеристик роговицы глаза животных до и на 3-и сутки после введения кЯКККЧ

Критерии оценки	Группы животных				
	1	4	2	3	5
Воспалительная реакция	2 балла (95%) 1 балл (5%)	2 балла (42%) 1 балл (58%)	2 балла (94%) 1 балл (6%)	2 балла (96%) 1 балл (4%)	0 баллов
Площадь стромального дефекта	3 балла (74%) 2 балла (26%)	3 балла (68%) 2 балла (32%)	3 балла (76%) 2 балла (24%)	3 балла (79%) 2 балла (21%)	0 баллов
Глубина стромального дефекта	2 балла (85%) 1 балл (15%)	2 балла (52%) 1 балл (48%)	2 балла (87%) 1 балл (13%)	2 балла (90%) 1 балл (10%)	0 баллов
Степень васкуляризации роговицы	0 баллов	0 баллов	0 баллов	0 баллов	0 баллов

У животных группы 1 воспалительная реакция была менее выражена, она была оценена в 1–2 балла, дефект эпителия составлял около 3 мм (рис. 3.8.5).



Рис. 3.8.5. Фотография роговицы кролика группы 1 на 3-и сутки после введения кЯКККЧ. Оценка воспалительной реакции – 1–2 балла.

На 7-е сутки клиническая картина была разной. Воспалительная реакция в группах 2–4 была оценена в 1–2 балла в группе 1 этот показатель составлял 1 балл. Наблюдалось формирование помутнения роговицы. В группе 5 роговица сохраняла прозрачность, воспалительной реакции не наблюдалось (табл. 3.8.2).

Таблица 3.8.2

Клинические характеристики роговицы глаза животных до и на 7-е сутки после введения КЯККЧ

Критерии оценки	Группы животных				
	1	2	3	4	5
Воспалительная реакция	2 балла (5%) 1 балла (95%)	2 балла (46%) 1 балл (54%)	2 балла (26%) 1 балл (74%)	2 балла (49%) 1 балл (51%)	0 баллов
Площадь стромального дефекта	1 балл (92%) 2 балла (8%)	2 балла (88%) 3 балла (12%)	1 балл (66%) 2 балла (34%)	2 балла (79%) 3 балла (21%)	0 баллов
Глубина стромального дефекта	2 балла (17%) 1 балл (83%)	2 балла (78%) 1 балл (22%)	2 балла (48%) 1 балл (52%)	2 балла (81%) 1 балл (19%)	0 баллов
Степень васкуляризации роговицы	1 балл	1 балл	1 балл	1 балл	0 баллов

Воспалительная реакция на 14-е сутки после выполнения экспериментальной ЛНР и лечения во всех группах животных оценивалась в 0 баллов; в группах 2 и 4 наблюдали выраженное помутнение роговицы. В группе 5 роговица сохраняла прозрачность, воспалительная реакция отсутствовала. В группе 3 отмечалось помутнение роговицы, но оно было менее выраженным, чем у животных групп 2, 4, 5. В группе 1 были отмечены наилучшие результаты (табл. 3.8.3; рис. 3.8.6).

Таблица 3.8.3

Оценка клинических характеристик роговицы глаза животных до и на 14-е
сутки после введения КЯКККЧ

Критерии оценки	Группы животных				
	1	2	3	4	5
Воспалительная реакция	0 баллов	0 баллов	0 баллов	0 баллов	0 баллов
Площадь стромального дефекта	1 балл (94%) 2 балла (6%)	2 балла (90%) 3 балла (10%)	1 балл (69%) 2 балла (41%)	2 балла (83%) 3 балла (17%)	0 баллов
Глубина стромального дефекта	2 балла (17%) 1 балл (83%)	2 балла (78%) 1 балл (22%)	2 балла (48%) 1 балл (52%)	2 балла (81%) 1 балл (19%)	0 баллов
Степень васкуляризации роговицы	1 балл	1 балл	1 балл	1 балл	0 баллов
Интенсивность помутнения	3 балла	8 баллов	5 баллов	8 баллов	0 баллов



Рис. 3.8.6. Помутнение в строме роговицы кролика группы 2 на 14-е сутки после введения КЯКККЧ.



Рис. 3.8.7. Фотография роговицы кролика группы 3 на 14-е сутки после введения кЯКККЧ.



Рис. 3.8.8. Фотография роговицы кролика группы 4 на 14-е сутки после введения кЯКККЧ. Глубокое помутнение роговицы.



Рис. 3.8.9. Фотография глаза кролика группы 1 на 14-е сутки после введения кЯКККЧ.

Таким образом, можно сделать вывод, что максимальная воспалительная реакция и последующее помутнение роговицы развивались в группах животных с экспериментальной ЛНР без лечения и с применением физиологического раствора. В группе животных, которым вводили неактивные кЯКККЧ отмечалась более положительная динамика, наилучший результат был у кроликов группы 1.

По результатам данного раздела была опубликована работа:

Свидко Е.Н. Клиническое обоснование применения криоконсервированных клеток кордовой крови при индукции экспериментальной лимбальной недостаточности роговицы / [Свидко Е.Н., Дёмин Ю.А.] // Проблемы екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2013. – Т. 118, №5. – С. 39–44.

3.9. Характер накопления ростовых факторов в тканях глаза после введения криоконсервированных ядродержащих клеток кордовой крови человека

Известно, что декстран имеет некоторые отрицательные свойства. При его введении могут возникать сенсibilизация и аллергические реакции. Известно, что декстран используют в качестве пролонгаторов в глазных каплях, так как полисахариды способны делать структуру препарата более вязкой, а значит дольше сохранятся на роговице. Вследствие этого препарат кЯКККЧ с декстраном трудно набрать в шприц, а выполнение инфильтрации роговицы требует определенных навыков. Также декстран вызывает отек и утолщение роговицы. Этот эффект используется при таком методе лечения, как кросс-линкинг при кератоконусе. При этом на некоторое время роговица теряет свои свойства, а именно прозрачность, и не может полноценно выполнять свои функции. Это влияет на длительность восстановительного периода после введения. Полисахариды, и в частности декстран, – благоприятная среда для размножения бактерий, поэтому повышается риск воспалительных заболеваний. Для его снижения в работе использовали инстилляцию антибактериальных капель «Левомецетин» («Фитофарм», Украина).

После введения в зону лимба суспензии кЯКККЧ у кроликов групп 2 и 3 наблюдали повышение содержания в ткани роговицы ростовых факторов BDNF, TGF-1b по сравнению с контрольной группой 1 (табл. 3.9.1; рис. 3.9.1, 3.9.2).

Очевидно, что такое увеличение содержания фактора роста в первый период после размораживания и введения кЯКККЧ в роговицу связано с повышенной проницаемостью клеток, подвергнутых замораживанию. К 21-м суткам от момента введения в роговицу кЯКККЧ концентрация фактора роста по сравнению с контрольной группой

увеличилась в 3 раза для BDNF и в 4 раза для TGF-1b. Наличие факторов роста в ткани глаза в этот срок наблюдения, возможно, связано с введением кЯКККЧ.

Таблица 3.9.1

Содержание факторов роста в роговице кроликов после введения кЯКККЧ

Срок после введения кЯКККЧ, сутки	Содержание TGF-1 β пг/мл			Содержание BDNF пг/мл		
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3
1	2,3 $\pm$ 0,2	(6,8 $\pm$ 0,2) ^{1,3}	(7,5 $\pm$ 0,5) ^{1,2}	4,1 $\pm$ 0,1	(11,9 $\pm$ 0,2) ^{1,3}	(11,7 $\pm$ 0,2) ^{1,2}
3	2,9 $\pm$ 0,1	(7,1 $\pm$ 0,1) ^{1,3}	(8,2 $\pm$ 0,2) ^{1,2}	5,3 $\pm$ 0,3	(18 $\pm$ 0,1) ^{1,3}	(17,3 $\pm$ 0,3) ^{1,2}
7	3,8 $\pm$ 0,1	(9,4 $\pm$ 0,3) ^{1,3}	(11 $\pm$ 0,1) ^{1,2}	6,8 $\pm$ 0,2	(23,2 $\pm$ 0,2) ^{1,3}	(25,4 $\pm$ 0,2) ^{1,2}
14	4,1 $\pm$ 0,2	(18,6 $\pm$ 0,2) ^{1,3}	(19,1 $\pm$ 0,1) ^{1,2}	8,2 $\pm$ 0,2	(29,2 $\pm$ 0,3) ^{1,3}	(32,2 $\pm$ 0,2) ^{1,2}
21	4,4 $\pm$ 0,1	(19,7 $\pm$ 0,2) ^{1,3}	(20,7 $\pm$ 0,3) ^{1,2}	9,5 $\pm$ 0,1	(36,1 $\pm$ 0,1) ^{1,3}	(42,8 $\pm$ 0,2) ^{1,2}

Примечание: различия значимы ($p < 0,05$) по сравнению с группами (¹ – группа 1; ² – группа 2, ³ – группа 3 в соответствующие сроки).

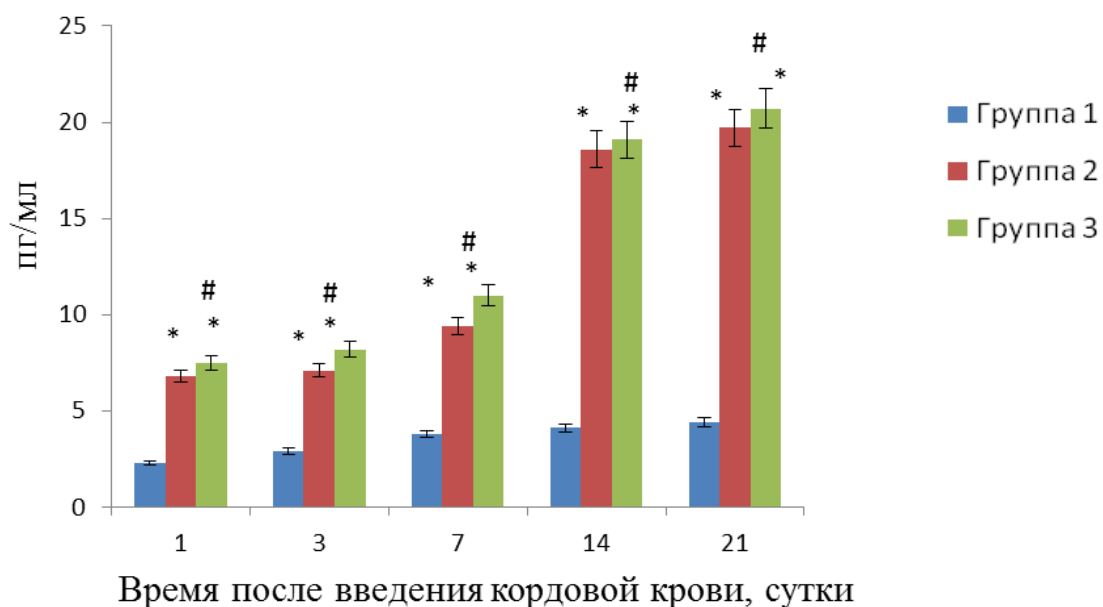


Рис. 3.9.1. Содержание TGF-1 β в роговице кролика после введения кЯКККЧ.

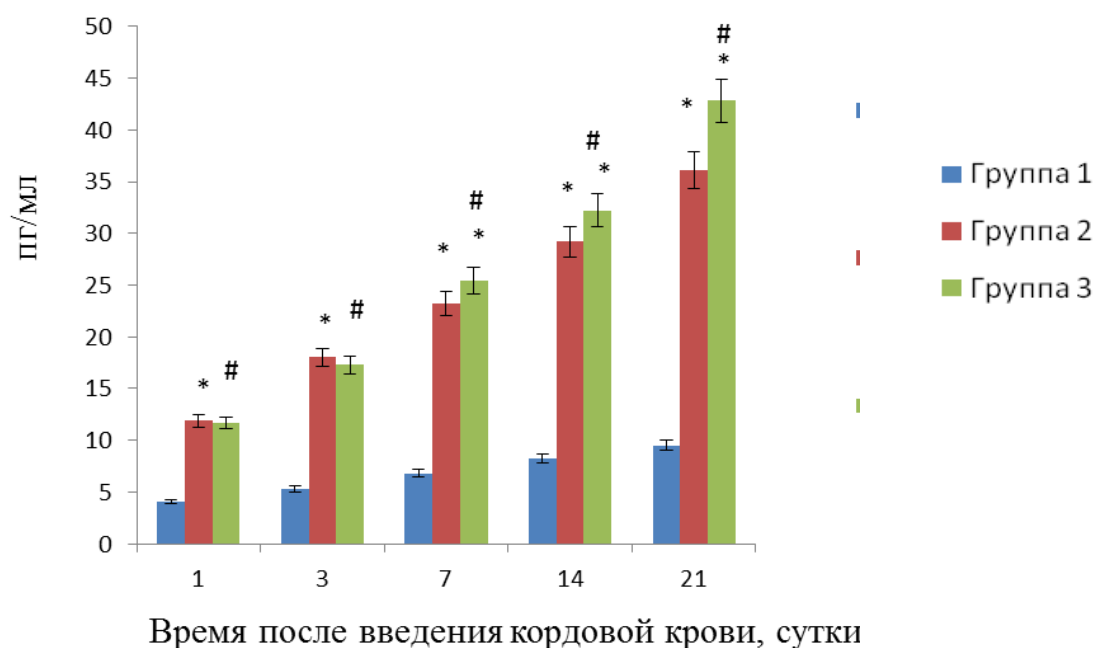


Рис. 3.9.2. Содержание BDNF в роговице кролика после введения кЯКККЧ.

Исходя из полученных данных можно предположить, что введение кЯКККЧ независимо от режима криоконсервирования способствует поступлению факторов роста, необходимых для регенерации

поврежденного лимба и роговицы. Очевидно, кЯКККЧ, введенные в зону лимба, поставляют биологически активные вещества (BDNF, TGF-1b), причем этот эффект более выражен при развитии такой патологии, как ЛНР. Характер накопления факторов роста в тканях роговицы не отличается при введении кЯКККЧ, криоконсервированных в режиме 1 и 2. Количество биологически активных веществ, обнаруженных в зоне лимба в срок до 21 суток с момента введения, повышается по мере увеличения продолжительности пребывания кЯКККЧ в роговице кроликов, а на 21-е сутки превышает показатели кроликов с развитием ЛНР. Таким образом, снижение содержания декстрана в среде замораживания не приводит к существенному снижению жизнеспособности кЯКККЧ по сравнению со стандартным методом получения и замораживания в среде с декстраном.

Поддержание постоянства любой эпителиальной структуры, в том числе роговичного эпителия, обеспечивается популяцией СК, которые представляют собой уникальный источник регенерации клеток как в физиологических условиях, так и при различных заболеваниях или травмах глаза. В случае тотальной ЛНР необходима пересадка ауто- либо аллогенных СК. В настоящее время многие исследования направлены на выяснение механизмов регуляции процессов дифференцировки СК [178].

Можно предположить, что в этом случае происходит активация клеток эпителия роговицы и СК лимба вследствие влияния на них биологически активных веществ кЯКККЧ – BDNF и TGF-1 β . Известно, что BDNF принадлежит к классу цитокинов, семейству факторов роста и подсемейству нейротрофинов и обладает выраженными нейрозащитными свойствами, угнетает клеточный апоптоз, препятствует гибели нейронов и стимулирует рост холинергических нервных волокон [16]. При экспериментальной ЛНР происходит резкое снижение содержания BDNF во внутриглазных структурах, поэтому важна компенсация его содержания, которую, по всей видимости, способны обеспечить кЯКККЧ. Биологически активное вещество TGF-1 β влияет на различные типы

клеток и участвует в регуляции роста клеток, их дифференцировке и апоптозе, а также в модуляции иммунной системы, способствует заживлению ран. Наиболее важным следует считать его участие в регенерации тканей. Установлено, что TGF-1 β активирует хемотаксис воспалительных клеток и синтез экстрацеллюлярного матрикса [42].

III

По результатам данного раздела была опубликована работа:

Свидко Е.Н. Характер накопления ростовых факторов в тканях глаза после введения криоконсервированных ядросодержащих клеток кордовой крови (кЯКККЧ) / [Е.Н. Свидко, В.В. Рязанцев, Л.А. Бабийчук, Ю.А. Дёмин] // <http://research-journal.org/>: Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. URL: <http://research-journal.org/?p=11898>.

РАЗДЕЛ 4

АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В последние годы в литературе все чаще появляются данные о ведущей роли ЛНР в патогенезе различных деструктивных процессов в роговице. Возможной причиной ЛНР может быть как дефицит стромального микроокружения, так и внешнее влияние, которое разрушает лимбальные СК. К таким патологиям относятся: аниридия; врожденная эритрокератодермия; кератит, связанный с различными эндокринными нарушениями; нейротрофическая кератопатия и хронический лимбит; химические или термические поражения, синдром сухого глаза; многочисленные операции или криотерапия; ношение контактных линз и тяжелые микробные инфекции [111].

Клиническими признаками ЛНР являются конъюнктивальный паннус, хроническое воспаление, помутнение роговицы различной степени выраженности, неоваскуляризация, недостаточное взаимодействие эпителиальных клеток, что, в свою очередь, выражается неровностью поверхности роговицы, деструкцией ее базальной мембраны, рецидивирующими эрозиями и язвами [118, 124].

Для исследования влияния кЯКККЧ на восстановление роговицы у животных с ЛНР необходимо создание экспериментальной модели. Наиболее оправданной моделью ЛНР является аппликация 0,04%-го раствора ММС на поверхность лимба. Однако известно, что данное вещество обладает цитостатическим действием на клетки роговицы и кЯКККЧ, потому необходимо знать точное время его выведения из роговицы. В связи с этим нами была использована модель, адаптированная к условиям проводимого эксперимента, с целью получения достоверных результатов и нивелирования цитостатического действия ММС как на саму роговицу глаза, так и на кЯКККЧ.

Результаты данного исследования показали, что разработанная модель ЛНР с аппликацией на роговицу 0,04%-го раствора ММС одна из самых простых и надежных, поскольку для ее создания необходимо минимальное время, а полное выведение препарата происходит в течение 26,2 ч.

Существуют различные способы введения СК в организм и, в частности, в глаз: внутривенное, парабульбарное, ретробульбарное и субконъюнктивальное. Нами был выбран наиболее патогенетически обоснованный метод введения клеток для лечения ЛНР, при котором клетки доставляются в строму роговицы. Кроме того, выбранный метод введения медицинских препаратов применяют непосредственно при лечении тяжелых хронических воспалительных процессов и язв роговицы.

На основании полученных результатов для проведения экспериментальной работы по лечению животных с экспериментальной ЛНР с помощью введения кЯКККЧ была выбрана доза клеток $0,5 \times 10^6$ в 0,5 мл.

Плазма пуповинной крови содержит комплекс биологически активных компонентов (гормонов, интерлейкинов, интерферонов, ростовых факторов, ферментов и проферментов, витаминов и микроэлементов, гемопоэтинов и адаптогенов, эндорфинов и энкефалинов) в физиологически сбалансированном соотношении [18, 29]. Криоконсервирование является безальтернативным методом хранения ядросодержащих клеток, в том числе и кордовой крови [30, 52].

Метод криоконсервирования ядросодержащих клеток кордовой крови человека в аутологичной плазме разработан на базе Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины и может использоваться в клинической практике сразу после размораживания, поскольку была применена безотмывочная технология криоконсервирования [12, 13].

Результаты экспериментальной работы продемонстрировали выраженную эффективность применения кЯКККЧ в лечении ЛНР, что выражалось в восстановлении показателей периферической крови. Для доказательства эффективности применения было необходимо установить, что используемые ЯКККЧ сохраняли свои свойства в процессе криоконсервирования. Результаты эксперимента подтвердили, что после отогрева кЯКККЧ количество ядросодержащих и относительное количество сохраненных клеток значимо не изменялось по сравнению с их содержанием в нативных образцах и оставалось на высоком уровне.

Результаты экспериментальной работы продемонстрировали выраженную эффективность применения кЯКККЧ в лечении ЛНР, что подтверждалась восстановлением показателей периферической крови.

Исследование лейкоцитарной формулы крови кроликов с экспериментальной ЛНР и после лечения показало, что в группах 2 и 4 нейтрофилез со сдвигом влево был более значимым во все сроки наблюдения, чем у животных, которым вводили кЯКККЧ. Изменения в клеточном составе крови у кроликов с экспериментальной ЛНР проявлялись в значимом снижении количества лимфоцитов ($p < 0,05$). Данный факт может свидетельствовать о проявлении стресс-индуцированной реакции при ЛНР с уменьшением количества лимфоцитов в результате их гибели.

Известно, что развитие в организме воспалительного процесса влияет на состояние эритроцитов крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что во всех опытных группах (за исключением группы 5) снизилось количество эритроцитов в крови уже на 2-е сутки развития патологии. Причиной недостаточного содержания эритроцитов в периферической кроветворной системе у животных с экспериментальной ЛНР может быть не только ингибция пролиферации и дифференцировки клеток эритроидного ростка кроветворения, но и их диапедез в различные

органы и ткани за счет повышения проницаемости сосудов при воспалительном процессе.

У животных группы 1 после терапии кЯКККЧ количество эритроцитов в крови начало повышаться уже на 3-и сутки. На 7-е сутки данный показатель не достигал уровня нормы, однако значимо ($p > 0,05$) превышал его по сравнению с таковыми в других группах. На 14-е сутки количество эритроцитов в крови животных этой группы превышало показатель нормы. Данный факт свидетельствует о том, что введение кЯКККЧ способно быстро мобилизовать организм животного для вывода эритроцитов в кровоток как из депо (селезенка), так и участков их формирования (костный мозг).

При исследовании содержания гемоглобина в крови животных с экспериментальной ЛНР (группа 2) наблюдали его снижение во все сроки наблюдения. У кроликов группы 1 после введения кЯКККЧ положительная динамика повышения содержания гемоглобина проявлялась уже на 3-и сутки. На 7-е сутки у животных этой группы данный показатель оставался, хотя и ниже нормы (группа 6), но был выше, чем в других опытных группах. А на 14-е сутки содержание гемоглобина у кроликов группы 1 несколько превышало норму (группа 6). Так, со 2-х суток развития патологии у животных группы 2 наблюдали увеличение показателя СОЭ на фоне повышения вязкости крови, уменьшения количества эритроцитов и увеличения числа лейкоцитов. У животных о признаках сохраняющегося воспалительного процесса при развитии ЛНР свидетельствовало увеличение показателей СОЭ вплоть до 14-х суток.

Следует отметить, что во всех группах опытных кроликов показатели СОЭ находились в пределах одинаковых величин и не имели выраженных различий по сравнению с контрольными. Исключением были показатели СОЭ у животных групп 2 и 4, которым проводили терапию ЛНР антибиотиком и вводили физраствор. У животных всех групп

показатели СОЭ превышали контрольные значения в течение всего срока наблюдения.

Проведенное исследование иммунной системы выявило наличие выраженных нарушений у кроликов с экспериментальной ЛНР. В первые сутки у животных наблюдалась транзиторная иммунологическая недостаточность, выражающаяся в снижении общего количества Т-лимфоцитов, регуляторных Т-хелперов и Т-супрессоров/цитотоксических клеток, которая сохранялась до 14-х суток исследования. Установленные признаки нарушения иммунной системы характерны для развития ЛНР. Однако индивидуальной иммунореактивностью организма животного обусловлены различия в течении патологического процесса. На основании результатов исследования Т-клеточного иммунитета, установленных клинических особенностей течения болезни, нами были выявлены коррелятивные связи между степенью угнетения иммунной системы и развитием ЛНР. Нормализация иммунных показателей коррелировала с динамикой ЛНР, степенью рубцевания пораженных тканей переднего отдела глазного яблока, возникновением помутнения оптических сред глаза. Проведенные исследования иммунной системы у животных с экспериментальной ЛНР выявили, что уже в первые сутки возникает выраженная иммуносупрессия, которая приводит к более тяжелому течению заболевания и имеет типичные признаки вторичного иммунодефицита (нарастающая лимфоцитопения, снижение количества Т-лимфоцитов), которые были наиболее выражены на 3-и сутки ЛНР. В этот период наблюдался «всплеск» воспалительной реакции, возникали различные осложнения (эрозии и язвы роговицы), отмечалось выраженное снижение митотической активности переднего эпителия роговицы. Введение кЯКККЧ животным группы 1 способствовало нормализации этих показателей, улучшению течения патологического процесса и его исходу. Вероятно, что в основе механизма действия кЯКККЧ лежит их иммуностропная активность, которая обеспечивает уменьшение проявлений

реакции тканей глаза на Т-антиген. Результаты проведенных иммунологических исследований позволили рекомендовать кЯКККЧ для лечения ЛНР в качестве иммуномодулятора. Благодаря наличию комплекса биологически активных веществ и клеточных элементов введение кЯКККЧ способствует коррекции измененных показателей Т-клеточного звена иммунной системы, которые развиваются при ЛНР как в глазу, так и организме в целом.

Снижение активности ИФН является ответной реакцией организма на травму и клинические проявления воспалительного процесса, поскольку она находится в тесной связи с иммунной системой. Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности ИФН- α и ИФН- γ в цельной крови и повышении их концентрации в слезной жидкости у животных с ЛНР. Если основной функцией иммунной системы является контроль за белковым постоянством многоклеточных популяций организма, то система ИФН контролирует генетическое постоянство организма. Доказано, что иммунная система имеет специализированные клетки и органы, а также для нее характерна специфичность реагирования на чужеродный агент, а система ИФН, напротив, функционирует практически во всех клетках организма и обладает только относительной видовой специфичностью. Показано, что при физиологическом состоянии спектр действия ИФН ограничен, но при стрессе, воспалении и других патологических состояниях расширяется количественный и качественный состав цитокинов, обладающих как местной, так и дистантной (гормональной) активностью. Механизм иммуномодулирующего действия ИФН связан с их влиянием на рецепторный аппарат клетки, внутриклеточные процессы и, как следствие, на отдельные функции иммунокомпетентных и воспалительных клеток (пролиферацию, дифференцировку, миграцию и др.).

Выраженная воспалительная реакция и последующее помутнение роговицы глаза развились у животных с экспериментальной ЛНР без

лечения и применением физиологического раствора. В группе животных с введением неактивных ЯКККЧ отмечалась более положительная динамика. Наилучший терапевтический эффект отмечался у животных группы 1, которым применяли кЯКККЧ: развивалось менее выраженное помутнение стромы, закрытие дефекта эпителия проходило значительно быстрее. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности введения кЯКККЧ при экспериментальной ЛНР. Кроме того, не только ЯКККЧ играют главную роль в регенеративных процессах в роговице, но и в микроокружении. Это доказывает эффективность использования нежизнеспособных кЯКККЧ. Полученные результаты сравнимы с группой 1. На основании полученных данных можно предположить, что введение кЯКККЧ способствует поступлению факторов роста, необходимых для регенерации поврежденного лимба и роговицы. Очевидно, что кЯКККЧ, введенные интрастромально, стимулируют выработку BDNF, TGF-1b, особенно при ЛНР.

В данной работе доказано, что концентрация факторов роста в тканях роговицы одинакова при введении ЯКККЧ, криоконсервированных с меньшим содержанием декстрана. Количество биологически активных веществ, обнаруженных в зоне лимба в срок до 21 суток с момента введения, повышается по мере увеличения продолжительности пребывания кЯКККЧ в роговице кроликов, а на 21-е сутки превышает показатели кроликов с развитием ЛНР. Очевидно, что уменьшение содержания декстрана в среде замораживания не приводит к существенному снижению жизнеспособности ЯКККЧ по сравнению со стандартным методом получения и замораживания в среде с декстраном.

Поддержание постоянства любой эпителиальной структуры, в том числе роговичного эпителия, обеспечивается популяцией СК, которые представляют собой уникальный источник регенерации клеток как в физиологических условиях, так и при различных заболеваниях или травмах глаза. В случае тотальной ЛНР необходима пересадка ауто- либо

аллогенных СК. В настоящее время многие исследования направлены на выяснение механизмов регуляции процессов дифференцировки СК.

Можно предположить, что в этом случае происходит активация клеток эпителия роговицы и СК лимба вследствие влияния на них биологически активных веществ кЯКККЧ – BDNF и TGF-1 β . Известно, что BDNF принадлежит к классу цитокинов, семейству факторов роста и подсемейству нейротрофинов и обладает выраженными нейрозащитными свойствами, угнетает клеточный апоптоз, препятствует гибели нейронов и стимулирует рост холинергических нервных волокон. При экспериментальной ЛНР происходит резкое снижение содержания BDNF во внутриглазных структурах, поэтому важна компенсация его содержания, которую, по всей видимости, способны обеспечить кЯКККЧ. Биологически активное вещество TGF-1 β влияет на различные типы клеток и участвует в регуляции роста клеток, их дифференцировке и апоптозе, а также в модуляции иммунной системы, способствует заживлению ран. Наиболее важным следует считать его участие в регенерации тканей. Установлено, что TGF-1 β активирует хемотаксис воспалительных клеток и синтез экстрацеллюлярного матрикса.

В данном исследовании было показано, что в тканях глаза у кроликов с ЛНР после введения кЯКККЧ повышается концентрация BDNF и TGF-1 β факторов роста.

Таким образом, проведенные исследования по изучению эффективности кЯКККЧ при ЛНР могут быть рекомендованы для широкого внедрения в клиническую практику. После подтверждения эффективности и безопасности нового метода лечения появится возможность его применения для лечения пациентов с тяжелыми заболеваниями и повреждениями глаз, которые ранее неизбежно приводили к значительному снижению зрения и слепоте. Своевременное использование данного метода лечения может сократить количество радикальных хирургических вмешательств.

ВЫВОДЫ

На основании комплексного исследования приведены теоретическое обобщения и решения научной задачи, которая заключается в определении влияния введения кЯКККЧ для восстановления структурно-функционального статуса и коррекции ЛНР.

1. Установлено, что криоконсервирование ЯКККЧ обеспечивает высокий уровень их сохранности. Количество кЯКККЛ в суспензии значительно не изменилось по сравнению с исходными образцами и оставалось на высоком уровне: $(1,35 \pm 0,38) \times 10^9$ (86,0%) и $(1,5 \pm 0,32) \times 10^9$ (97,0 %) соответственно. Это подтверждается оценкой их структурной организации, а также функциональной активностью в условиях *in vitro* и *in vivo*.

2. Была модифицирована экспериментальная модель ЛНР. Разработан способ введения кЯКККЧ (интрастромально) и оптимальную дозу ($0,5 \times 10^6$ клеток в 0,5 мл).

3. Проведенные результаты иммунологического исследования состояния Т-клеточного звена иммунной системы у кроликов с ЛНР позволили рекомендовать кЯКККЧ как иммунокорректор. Иммунорегуляторный индекс был увеличен уже на 3-е сутки ($p < 0,05$), превышал контроль и был повышенным как на 7-е, так и на 14-е сутки.

4. Показана способность кЯКККЧ нормализовать показатели цитокинов в сыворотке крови и слезной жидкости у животных с ЛНР: снижение содержания ИФН- α и повышение ИФН- γ . В крови и слезной жидкости всех животных, которых лечили введением кЯКККЛ, на фоне терапии показатель ИФН- α уже до 7 суток практически достигал нормы. При исследовании содержания ИФН- γ на 7-е сутки наблюдали значимое его повышение, а на 14-е сутки – восстановление.

5. Установлено, что введение кЯКККЧ является важным этапом для коррекции показателей периферической крови при лечении ЛНР в

условиях эксперимента. Наблюдается практически полная нормализация показателей уже на 7-е сутки.

6. Доказано, что повышение секреции ростовых факторов (BDNF по сравнению с контрольной группой увеличился в 3 раза, а для TGF-1b – в 4 раза) после введения кЯКККЧ кроликам в экспериментальной модели ЛНР ускоряет процессы регенерации клеток лимба, эпителия и стромы роговицы.

7. Обосновано, что применение кЯКККЧ в среде с меньшим содержанием декстрана (не более 0,4%) в равной степени обладает терапевтической эффективностью.

8. Применение кЯКККЧ как препарата для терапии ЛНР способствовало восстановлению структуры роговицы. Полученные результаты экспериментального исследования позволяют рекомендовать кЯКККЧ при лечении ЛНР в клинической практике.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров К.М. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопоэтического потенциала / К.М. Абдулкадыров, Н.А. Романенко // Трансфузиология. – 2003. – Т. 4, №1. – С. 44–46.
2. Адсорбционно-реологические свойства сыворотки крови при артритах / Ю.О. Брыжатая, Л.В. Лукашенко, О.В. Синяченко, Г.А. Гончар // Міжнародний вісник медицини. – 2011. – Т. 4, № 1–2. – С. 17–20.
3. Азнабаев М.Т. Азидарег в лечении травм роговицы / М.Т. Азнабаев, В.К. Суркова, З.А. Даутова // X съезд офтальмологов Украины: тез. докл., Одеса, 2002. – С. 232.
4. Амбариумян А.В. Многослойная трансплантация амниотической мембраны при нейротрофических язвах различной этиологии: сборник науч. тр. Рос. общенац. офтальмол. форум / А.В. Амбариумян. – Т. 2. – М., 2009. – С. 251–255.
5. Амниопластика роговицы: основные принципы хирургической техники операции / А.А. Асанова, Б.О. Сулеева, М.К. Дикамбаева, Т.К. Кадыралиев // Медицинские кадры XXI века. – 2009. – №1. – С. 49–55.
6. Астахов Ю.С. Препараты, стимулирующие трофические и регенерационные процессы (для местного применения): лекарственный справочник врача офтальмолога / Ю.С.Астахов. – СПб, 2002. – 177 с.
7. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Медицина, 1962. – С. 180.
8. Бездетко П.А. Аутолимбоккератопломбирование как метод хирургического лечения рецидивирующего герпетического кератита / П.А. Бездетко, Е.Н. Ильина, М.Г. Лысенко // Офтальмологический журнал. – 2009. – №5. – С. 10–14.
9. Бездетко П.А. Конъюнктивальная иммобилизация аутологичных кле-

ток лимба в лечении рецидивирующих герпетических кератитов / П.А. Бездетко, Е.Н. Ильина // Харківська хірургічна школа. – 2009. – №4. – С. 68–71.

10. Бессмертный, А.М. Применение препарата «Корнерегель» в лечении роговичных осложнений после комбинированных операций по поводу катаракты и глаукомы / А.М. Бессмертный, О.М. Филиппова // Глаукома. – 2004. – №2. – С. 24–26.

11. Варданян И.Р. Клинико-иммунологические характеристики и лечение больных с ожогами глаз и послеожоговыми бельмами роговицы: автореф. дис. канд. мед. наук / И.Р. Варданян. – М., 2000. – 18 с.

12. Влияние гипотермического хранения до и после криоконсервирования на свойства ядерных компонентов и плазмы цельной кордовой крови человека / А.А. Цуцаева, А.Я. Цыганенко, И.А. Желтякова [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, №1. – С. 45–55.

13. Влияние криоконсервирования по двухэтапной программе в растворе высокомолекулярного декстрана на цитоморфологические и функциональные свойства клеток кордовой крови человека / О.Ю. Кожина, М.В. Останков, И.Г. Гриша, Н.А. Бондарович // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №1. – С. 58–65.

14. Войно–Ясенецкий В.В. Разрастание и изменчивость тканей глаза при его заболеваниях и травмах / В.В. Войно–Ясенецкий. – Киев, 1979. – 184 с.

15. Глазные капли карнозина в лечении метаболических поражений роговицы: методические рекомендации № 98/261 / Ю.Ф. Майчук, Л.А. Ларина, В.И. Сергиенко, В.Е. Формазюк. – М., 1999. – 12 с.

16. Головки А.И. Нейротрофические факторы головного мозга. Нейрохимические и наркологические аспекты / А.И. Головки // Нейрохимия. – 2008. – Т. 25, №4. – С. 261–271.

17. Гольцев А.Н. Пуловинная кордовая кровь человека как источник гемопоэтических клеток для клинического применения. Часть II.

Иммунологическая характеристика / А.Н. Гольцев, Т.А. Калиниченко // Проблемы криобиологии. – 1998. – №1. – С. 3–24.

18. Грищенко В.И. Перспективы и возможности использования плацентарной крови / В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк // Медицинские вести. – 1997. – Т. 4. – С. 26–27.

19. Груша О.В. Способ лечения химических ожогов роговой оболочки в условиях биологической защиты / О.В. Груша, Л.П. Чередниченко // Новое в лечении ожогов глаз: симпозиум с участием иностранных специалистов: тез. докл. – М., 1989. – С. 39–41.

20. Гундорова Р.А. Лечение синдрома «сухого глаза» при ожоговой болезни глаз / Р.А. Гундорова, П.В. Макаров, З.Р. Дадашева // Русский медицинский журнал. – 2005. – №11. – С. 24–26.

21. Гусев Е.Ю. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса / Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев, Л.Н. Юрченко // Цитокины и воспаление. – 2007. – №4. – С. 9–21.

22. Егоров Е.А. Новые стимуляторы репаративной регенерации роговицы / Е.А. Егоров, Н.И. Калинич, Е.А. Киясов // Вестник офтальмологии. – 1999. – Т. 115, №6. – С. 13–16.

23. Заготовка, криоконсервирование и клиническое применение гемопоэтических клеток кордовой крови человека: методические рекомендации / А.А. Цуцаева, В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк [и др.]. – Харьков, 2000. – 18 с.

24. Захарова И.А. Клиническая оценка эффективности альфа-интерферона в купировании посттравматического воспалительного процесса в роговице/ И.А.Захарова, В.Ю. Махмутов // Актуальные вопросы воспалительного заболевания глаз: научно–практич. конференция. – М., 2001. – С. 315–317.

25. Ильина Е.Н. Аутолимбальная трансплантация в лечении стромальных метагерпетических кератитов, осложнённых лимбальной недостаточностью / Е.Н. Ильина // Харківська хірургічна школа. – 2010. –

№5. – С. 66–69.

26. Калинин Н.И. Новые стимуляторы репаративной регенерации роговицы в лечении заболеваний переднего отрезка глаза: автореф. дис. канд. мед. наук / Н.И. Калинин. – М., 2000. – 24 с.

27. Ковальчук Л.В. Иммунокоррекция цитокинами / Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская, В.А. Левченко // Вестник РГМУ. – 2002. – №3. – С. 6–11.

28. Ковальчук Л.В. Система цитокинов: методические рекомендации / Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская, Э.И. Рубакова. – М., 1999. – С. 1–78.

29. Кордовая кровь как компонент поддерживающей терапии / А.А. Цуцаева, А.В. Кудогоцева, А.В. Щеглов [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2001. – №3. – С. 93.

30. Криобиологические технологии как компонент оптимизированных методов лечения аутоиммунных заболеваний / А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Ю.А. Гаевская [и др.] // Клін. імунол. алергол. інфектол. – 2009. – Т. 20–21, №1–2. – С. 46–51.

31. Криоконсервирование как фактор модификации структурно-функционального состояния и механизма реализации лечебного эффекта клеток стволового компартмента в условиях развития патологий аутоиммунного генеза / А.Н. Гольцев, Л.В.Останкова, Т.Г. Дубрава [и др.]; под ред. А.Н. Гольцева // Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. – Харьков, 2012. – С. 543–551.

32. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.

33. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.

34. Лечение синдрома «сухого глаза» после сквозной и послойной пересадки роговицы препаратами Корнерегель и Видисик / А.А. Каспаров, Г.С. Полуниин, Е.Г. Полунина, Т.Н. Сафонова // Синдром сухого глаза. – 2003. – №4. – С. 17–20.

35. Лечение химических ожогов глаз субконъюнктивальным введением бетамецила в эксперименте / Н.Б. Леонидов, М.А. Колесникова, Н.Г. Селезнев, С.И. Успенская // Ожоги глаз и их последствия: материалы науч.-практ. конф. – М., 1997. – С. 22–23.
36. Лобынцева Г.С. Теоретические вопросы криоконсервирования стволовых клеток. Особенности работы криобанка пуповинной крови / Г.С. Лобынцева // Трансплантология. – 2007. – Т. 3, №1. – С. 104.
37. Майчук Ю.Ф. Новое в эпидемиологии и фармакотерапии глазных инфекций / Ю.Ф. Майчук // Клиническая офтальмология. – 2000. – Т. 1, №2. – С. 48–51.
38. Малашенкова И.К. Интерфероны и индукторы их синтеза (обзор) / И.К. Малашенкова, Э.Б. Газулахова, Н.А. Дидковский // Терапевтический архив. – 1998. – №2. – С. 35–39.
39. Маркова Т.П. Растительный иммуностимулирующий препарат – Иммунал. Перспективы применения в медицине / Т.П. Маркова // Российский Медицинский Журнал. – 2002. – Т. 10, №28. – С. 1330–1331.
40. Милюдин Е.С. Экспериментальная модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия / Е.С. Милюдин // Вестник СамГУ. Естественная серия. – 2006. – Т. 49, №9. – С. 219–226.
41. Мошетьева Л.К. Применение препаратов флоксал и корнерегель у пациентов с механическими и инфекционными осложнениями контактной коррекции зрения / Л.К. Мошетьева, Г.М. Чернакова, И.В. Ярлыкова // Клин. офтальмология. – 2002. – Т. 3, №1. – С. 26–28.
42. Никитин Н.А. Роль TGF β в офтальмологии / Н.А. Никитин, Ш.Р. Кузбеков // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, №1. – С. 3–9.
43. Опыт применения солкосерила в лечении заболеваний роговицы / М.М. Краснов, А.А. Каспаров, Ю.В. Юдина, В.А. Оганесянц // Вестник офтальмологии. – 1982. – №4. – С. 64–67.

44. Пат. 2062079, Российская Федерация, А 61 F 9/00. Глазные капли на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты для лечения травматических повреждений, химических ожогов и трофических нарушений роговицы, конъюнктивы, в послеоперационном периоде при кератопластике и кератотомии, а также для адаптации ношения контактных линз / Азнабаев М.Т., Башкатов С.А., Азнабаев Б.М. [и др.]; заявитель и патентообладатель Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней; заявл. 26.05.1999; опубл. 20.02.2001.
45. Пат. 31847А, Україна, МПК А01N1/02. Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові / А.О. Цуцаєва, В.І. Грищенко, О.В. Кудокоцева [та ін.]; заявл. 05.11.1998; опубл. 15.12.2000, Бюл. №7. – С. 1–10.
46. Пат. 92227, Україна, МПК А01N1/02. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клггин кордової крові, у тому числі стовбурових гемопоетичних кліггин / Л.О. Бабійчук, В.І. Грищенко, Т.М. Гуріна [та ін.]; заявл. 05.12.2008; опубл. 11.10.2010, Бюл. №19.
47. Петренко А.Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / А.Ю. Петренко, Ю.А. Хунов, Э.Н. Иванов. – Луганск: Пресс-Экспресс, 2011. – 368 с.
48. Пирс Э. Методическое руководство по гистологической технике и гистохимии / Э. Пирс. – М.: Наука, 1962. – С. 73.
49. Применение аутологичных клеток лимба в лечении герпетических кератитов / Е.П. Мужичук, Е.Н. Ильина, Т.Н. Довжук, О.В. Заволока // Сучасні методи діагностики та лікування в офтальмології: II Всеукраїнська конференція молодих вчених офтальмологів України, 19–20 червня 2008: матеріали конференції. – Харків, 2008. – С. 68–70.
50. Пуповинная кровь: перспективы применения стволовых клеток / В.И. Цымбалюк, Н.Я. Жилка, В.П. Кидонь, Н.М. Баханцова // Здоров'я України. – 2007. – №9. – С. 74.
51. Репин В.С. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная

биология и медицина / В.С. Репин. – М.: Реметэкс, 2002. – 165 с.

52. Роль криоконсервированного лейкоконцентрата кордовой крови в коррекции вторичных иммунодефицитных состояний вирусного генеза / О.Ю. Кожина, М.В. Останков, Н.А. Бондарович [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №3. – С. 311.

53. Роль лимбальных клеток в регенерации роговицы / А.Г. Попандопуло, А.С. Кавелина, О.Н. Иванова, Г.И. Дрожжина // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, №1. – Ч. 2. – С. 158–160.

54. Синдром дефицита лимбальных стволовых клеток роговицы / А.А. Асанова, Б.О. Сулеева, М.К. Дикамбаева, Т.К. Кадыралиев // Медицинские кадры XXI века. – 2009. – №1. – С. 109–111.

55. Скрипник Р.Л. Новое в лечении синдрома сухого глаза / Р.Л. Скрипник, И.Д. Скрипниченко // Український медичний часопис. – 2011. – №1. – С. 79–80.

56. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е.А. Кост. – М.: Медицина, 1968. – 437 с.

57. Структурно-функциональное состояние и жизнеспособность ядродержащих клеток пуповинной крови после криоконсервирования / Л.А. Бабийчук, В.И. Грищенко, П.М. Зубов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – №3. – С. 77–81.

58. Стукалов С.Е. Применение глазных пленок с альгинатом натрия при язвенных поражениях роговицы / С.Е. Стукалов, В.В. Попова, О.В. Покровская // Ерошевские чтения: тр. всерос. конф. – Самара, 2002. – С. 254–255.

59. Хаитов Р.М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2000. – №1. – С. 9–16.

60. Царев С.В. Эффективность Иммунала как неспецифического иммуностимулятора / С.В. Царев // Русский Медицинский Журнал. – 2003. – Т. 11, №16. – С. 950.
61. Чаланова Р.И. Клинико-иммунологические особенности стресс-реактивности организма в динамике клинического течения ожоговой болезни глаз/ Р.И. Чаланова, Т.В. Дегтяренко // Вестник офтальмологии. – 2014. – №1. – С. 42–45.
62. Ченцова Е.В. Клиническая апробация нового низкомолекулярного сывороточного полипептида при ожоговых и посттравматических повреждениях роговицы / Е.В.Ченцова, И.Ю. Романова // Ожоги глаз и их последствия: материалы науч.-практ. конф. – М., 1997. – С. 19–20.
63. Ченцова Е.В. Новый метод лечения заболеваний роговицы с использованием культивированных *in vitro* эмбриональных клеток роговиц человека /Е.В.Ченцова, Г.Г. Петрашвили, И.Р. Арутюнова // VII съезд офтальмологов России: тез. докл. – М., 2000. – Ч. 2. – С. 50.
64. Черныш В.Ф. Лимбальная трансплантация в зрительной реабилитации пострадавших с последствиями тяжелых химических ожогов глаз /В.Ф. Черныш, М.М. Шишкин // Неотложная помощь, реабилитация и лечение осложнений при травмах органа зрения в чрезвычайных ситуациях: материалы конференции. – М., 2003. – С. 42–43.
65. Шабалина Н.В. Интерфероновая система человека: биологическая роль и взаимосвязь с иммунной системой / Н.В. Шабалина, В.В. Длин, В.В. Малиновская // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 1998. – №5. – С. 29–34.
66. Шаймарданова Л.Р. Перспективы исследования взаимодействия «взрослых» стволовых клеток / Л.Р. Шаймарданова, В.С. Пикалюк // Таврический медико-биологический вестник. – 2011. – Т. 14, №1. – С. 169–172.
67. 13 Years of cultured limbal epithelial cell therapy: A review of the outcomes / O. Baylis, F. Figueiredo, C. Henein [et al.] // J Cell Biochem. – 2011.

– Vol. 112. – P. 993–1002.

68. 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, №10. – P. 1571–1578. – doi: 10.1097/TP.0b013e3181a4bbf2.

69. A review of factors influencing the banking of collected umbilical cord blood units / D. Allen, T. Petraszko, H. Elmoazzan, S. Smith // *Stem Cell International*. – 2013. – 7 p. – doi: org/10.1155/2013/463031.

70. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells / C.S. de Paiva, Z. Chen, R.M. Corrales [et al.] // *Stem Cells*. – 2005. – Vol. 23. – P. 63–73.

71. Abdiu O. Antiangiogenic activity in tears: presence of pigment-epithelium-derived factor. New insights and preliminary results / O. Abdiu, G. Van Setten // *Ophthalmic Res*. – 2008. – Vol. 40, №1. – P. 16–18.

72. Abu El-Asrar A.M. Evolving strategies in the management of diabetic retinopathy / A.M. Abu El-Asrar // *Middle East Afr J Ophthalmol*. – 2013. – Vol. 20, №4. – P. 273–282.

73. Ahmad S. Concise review: limbal stem cell deficiency, dysfunction, and distress / S. Ahmad // *Stem Cells Transl Med*. – 2012. – Vol. 1, №2. – P. 110–115.

74. Ahmad S. Corneal epithelial stem cells: characterization, culture and transplantation / S. Ahmad, F. Figueiredo, M. Lako // *Regen Med*. – 2006. – Vol. 1. – P. 29–44.

75. Alio J.L. Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders / J.L. Alio, A.E. Rodriguez, D. WróbelDudzińska // *Curr Opin Ophthalmol*. – 2015. – doi: 10.1097/ICU.0000000000000169.

76. Alkali burn versus suture-induced corneal neovascularization in C57BL/6 mice: an overview of two common animal models of corneal neovascularization / C. Giacomini, G. Ferrari, F. Bignami, P. Rama // *Exp Eye Res*. – 2014. – P. 121–124.

77. Allogeneic hematopoietic SCT for patients with autoimmune diseases / T. Daikeler, T. Hügler, D. Farge [et al.] // Bone Marrow Transplant. – 2009. – Vol. 44. – P. 27–33.
78. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency / D.F. Anderson, P. Ellies, R.T. Pires, S.C. Tseng // Br J Ophthalmol. – 2001. – Vol. 85. – P. 567–575.
79. Amniotic membrane use in ophthalmology / J.A. Gomes, A. Romano, M.S. Santos, H.S. Dua // Curr Opin Ophthalmol. – 2005. – Vol. 16. – P. 233–240.
80. An efficient and easy-to-use cryopreservation protocol for human ES and iPS cells / H. Baharvand, G.H. Salekdeh, A. Taei [et al.] // Nat Protoc. – 2010. – Vol. 5. – P. 588–594.
81. Angunawela R.I. Ex-vivo ocular surface stem cell therapies: current techniques, applications, hurdles and future directions / R.I. Angunawela, J.S. Mehta, J.T. Daniels // Expert Reviews in Molecular Medicine. – 2013. – doi: 10.1017/erm.2013.5.
82. Anshu A. Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with Descemet's membrane endothelial keratoplasty / A. Anshu, M. Price, F. Price // Ophthalmology. – 2012. – Vol. 19, №3. – P. 536–540.
83. Application of adipose-derived stem cells on scleral contact lens carrier in an animal model of severe acute alkaline burn / L. Espandar, D. Caldwell, R. Watson [et al.] // Eye & Contact Lens Science & Clinical Practice. – 2014. – Vol. 40, №4. – doi: 10.1097/ICL.0000000000000045.
84. Application of umbilical cord serum eyedrops for recurrent corneal erosions / K.C. Yoon, W. Choi, I.C. You, J. Choi // Cornea. – 2011. – Vol. 30. – P. 744–748.
85. Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of neurotrophic keratitis / K.C. Yoon, I.C. You, S.K. Im [et al.] // Ophthalmology. – 2007. – Vol. 114. – P. 1637–1642.
86. Autoimmune uveitis: the associated proinflammatory molecules and the

- search for immunoregulation / A.G. Commodaro, V. Bueno, R.Jr. Belfort, L.V. Rizzo // *Autoimmun. Rev.* – 2011. – Vol. 10, №4. – P. 205–209.
87. Baradaran-Rafii A. Sulfur mustard-induced ocular surface disorders / A. Baradaran-Rafii, M. Eslani, S.C. Tseng // *Ocul Surf.* – 2011. – Vol. 9. – P. 163–178.
88. Biber J.M. Management of ocular stem cell disease / J.M. Biber, E.J. Holland, K.D. Neff // *Int Ophthalmol Clin.* – 2010. – Vol. 50. – P. 25–34.
89. Biotechnological and biomedical applications of mesenchymal stem cells as a therapeutic system / A. Rahimzadeh, F.S. Tabatabaei Mirakabad, A. Movassaghpour [et al.]. // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* – 2014. – P. 1–12.
90. Blanpain C. Epithelial stem cells: turning over new leaves / C. Blanpain, V. Horsley, E. Fuchs // *Cell.* – 2007. – Vol. 128. – P. 445–458.
91. Bobba S. Contact Lenses: A Delivery Device for Stem Cells to Treat Corneal Blindness / S. Bobba, N. Di Girolamo // *Optom Vis Sci.* – 2015. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26390346>.
92. Bronner M.E. Human fetal keratocytes have multipotent characteristics in the developing avian embryo / M.E. Bronner, J.R. Chao, P.Y. Lwigale // *Stem Cells Dev.* – 2013. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23461574>.
93. Broxmeyer H.E. Cord blood hematopoietic stem cell transplantation / H.E. Broxmeyer // *StemBook* [Internet] Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2010. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20614635>.
94. Cain C.J. Hematopoietic stem cell fate decisions are regulated by Wnt antagonists: comparisons and current controversies / C.J. Cain, J.O. Manilay // *Experimental Hematology.* – 2013. – Vol. 41, №1. – P. 3–16.
95. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells as trophic mediators / A.I. Caplan, J.E. Dennis // *J Cell Biochem.* – 2006. – Vol. 98. – P. 1076–1084. – doi: 10.1002/jcb.20886.
96. Cell transplantation therapy for stroke / T. Bliss, R. Guzman, M. Daadi, G.K. Steinberg // *Stroke.* – 2007. – Vol. 38. – P. 817–826.

97. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells / J.M. Polo, S. Liu, M.E. Figueroa [et al.] // *Nat Biotechnol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 848–855.
98. Chee K.Y. Limbal stem cells: the search for a marker / K.Y. Chee, A. Kicic, S.J. Wiffen // *Clin Experiment Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 34. – P. 64–73.
99. Chen S.Y. Optimization of ex vivo expansion of limbal epithelial progenitors by maintaining native niche cells on denuded amniotic membrane / S.Y. Chen, M. Mahabole, S.C. Tseng // *Transl Vis Sci Technol.* – 2013. – Vol. 2. – P. 1.
100. Clinical study on 137 cases of unrelated single unit umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation / H. Zhu, Y. Zhang, H. Jin [et al.] // *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2015. – Vol. 36, №2. – P. 140–143. – doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.02.012.
101. Collection, processing and testing of bone, corneas, umbilical cord blood and haematopoietic stem cells by European Blood Alliance members / M. Närhi, O. Natri, I. Desbois [et al.] // *Vox Sang.* – 2013. – doi: 10.1111/vox.12053.
102. Comparative analysis of the basement membrane composition of the human limbus epithelium and amniotic membrane epithelium / T. Dietrich-Ntoukas, C. Hofmann-Rummelt, F.E. Kruse [et al.] // *Cornea.* – 2012. – Vol. 31. – P. 564–569.
103. Comparison between serum-free and fibroblast cocultured single-cell clonal culture systems: evidence showing anti-apoptotic activity is present in 3T3 fibroblast-conditioned medium / S.C. Tseng, F.E. Kruse, J. Merritt, D.Q. Li // *Curr. Eye Res.* – 1996. – Vol. 15. – P. 973–984.
104. Concise review: Hurdles in a successful example of limbal stem cell-based regenerative medicine / G. Pellegrini, P. Rama, A. Di Rocco [et al.] // *Stem Cells.* – 2014. – Vol. 32. – P. 26–34.

105. Consecutive expansion of limbal epithelial stem cells from a single limbal biopsy / M. López-Paniagua, T. Nieto-Miguel, A. De La Mata [et al.] // *Current Eye Research*. – 2013. – №38. – P. 537–549.
106. Copley M.R. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage / M.R. Copley, P.A. Beer, C.J. Eaves // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Vol. 10, №6. – P. 690–697. – doi: 10.1016/j.stem.2012.05.006.
107. Cord blood V α 24– V β 11+ natural killer T cells display a Th2-chemokine receptor profile and cytokine responses / S. Harner, E. Noessner, K. Nadas [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, №1. – doi: 10.1371/journal.pone.0015714.
108. Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits / H. Reinshagen, C. Auw-Haedrich, R.V. Sorg [et al.] // *Acta Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 89, №8. – P. 741–748.
109. Corneal transplantation / D.T. Tan, J.K. Dart, E.J. Holland [et al.] // *Lancet*. – 2012. – Vol. 379. – P. 1749–1761. – doi: [10.1016/S0140-6736\(12\)60437-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60437-1).
110. Critical appraisal of *ex vivo* expansion of human limbal epithelial stem cells / S.C. Tseng, S.Y. Chen, Y.C. Shen [et al.] // *Curr Mol Med*. – 2010. – Vol. 10. – P. 841–850.
111. Cultivated oral mucosa epithelium in ocular surface reconstruction in aniridia patients / D. Dobrowolsk, B. Orzechowska-Wylegala, W. Bogumil [et al.] // *Biomed Res Int*. – 2015. – 7 p. – <http://dx.doi.org/10.1155/2015/281870>.
112. Cytokines and Biologics in non-infectious autoimmune uveitis: Bench to Bedside / R. Agrawal, J. Iyer, J. Connolly [et al.] // *Indian J Ophthalmol*. – 2014. – Vol. 62, №1. – P. 74–81.
113. De Luca M. Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts / M. De Luca, G. Pellegrini, H. Green // *Regen Med*. – 2006. – Vol. 1. – P. 45–57.
114. Differences between niche cells and limbal stromal cells in maintenance of corneal limbal stem cells / Y. Li, T. Inoue, F. Takamatsu [et al.] // *Invest*

Ophthalmol Vis Sci. – 2014. – Vol. 55. – P. 1453–1462.

115. Differentiation of human limbal-derived induced pluripotent stem cells into limbal-like epithelium / D. Sareen, M. Saghizadeh, L. Ornelas [et al.] // Stem Cells Translational Medicine. – 2014. – Vol. 3, №9. – P. 1002–1012. – doi: 10.5966/sctm.2014-0076.

116. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into corneal epithelial-like cells / D. Yu, M. Chen, X. Sun [et al.] // Cell Biol Int. – 2013. – Vol. 37. – P. 87–94.

117. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults / K.K. Ballen, T.R. Spitzer, B.Y. Yeap [et al.] // Biol Blood Marrow Transplant. – 2007. – Vol. 13. – P. 82–89.

118. Dua H.S. Limbal stem cells of the corneal epithelium / H.S. Dua, A. Azuara-Blanco // Surv Ophthalmol. – 2000. – Vol. 44, №5. – P. 415–425.

119. Effect of cord blood serum on ex vivo human limbal epithelial cell culture / A. Chakraborty, J. Dutta, S. Das, H. Datta // J Ocul Biol Dis Infor. – 2013. – Vol. 5, №3–4. – P. 77–82. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24596943>.

120. Effect of a hexosylceramide fraction of the hemodialysate Solcoseryl on wound-healing angiogenesis / J. Ninikoski, M. Laato, R. Tschannen, W. Fraefel // J. Surg Res. – 1986. – Vol. 40, №3. – P. 261–264.

121. Effect of topical mitomycin C on corneal endothelium / A. Panda, J. Pe'er, A. Aggarwal [et al.] // Am J Ophthalmol. – 2008. – Vol. 145. – P. 635–638.

122. Engraftment kinetics and graft failure after single umbilical cord blood transplantation using myeloablative conditioning regimen / A. Ruggeri, M. Labopin, M.P. Sormani [et al.] // Haematologica. – 2014. – Vol. 99. – P. 1509–1515. – doi: 10.3324/haematol.2014.109280.

123. Evaluation of quality parameters for cord blood donations / U. Salge-Bartels, H.M. Huber, K. Kleiner [et al.] // Transf Med Hemother. – 2009. – Vol. 36. – P. 317–324. – doi: 10.1159/000232384.

124. Evaluation of umbilical cord serum therapy in acute ocular chemical burns / N. Sharma, M. Goel, T. Velpandian [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – Vol. 52. – P. 1087–1092.
125. Ex vivo cultivation of corneal limbal epithelial cells in a thermoreversible polymer (Mebiol Gel) and their transplantation in rabbits: an animal model / G. Sitalakshmi, B. Sudha, H.N. Madhavan [et al.] // *Tissue Engineering. Part A.* – 2009. – Vol. 15, №2. – P. 407–415. – doi: 10.1089 /ten.tea.2008.0041.
126. Ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells on amniotic membrane using a culture medium with human serum as single supplement / A. Shahdadfar, K. Haug, M. Pathak [et al.] // *Exp Eye Res.* – 2012. – №97. – P. 1–9.
127. Ex vivo expansion of conjunctival and limbal epithelial cells using cord blood serum-supplemented culture medium / L.P. Ang, T.P. Do, Z.M. Thein [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – Vol. 52. – P. 6138–6147.
128. Frizzled 7 maintains the undifferentiated state of human limbal stem/progenitor cells / H. Mei, M.N. Nakatsu, E.R. Baclagon [et al.] // *Stem Cells.* – 2014. – Vol. 32. – P. 938–945.
129. Garweg J.G. Effects of daunorubicin, mitomycin C, azathioprine and cyclosporin A on human retinal pigmented epithelial, corneal endothelial and conjunctival cell lines / J.G. Garweg, M. Wegmann-Burns, D. Goldblum // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 244, №3. – P. 382–389.
130. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium / R. Hayashi, Y. Ishikawa, M. Ito [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, №9. – P. 454–435.
131. González S. Presence of native limbal stromal cells increases the expansion efficiency of limbal stem/progenitor cells in culture / S. González, S.X. Deng // *Exp Eye Res.* – 2013. – Vol. 116. – P. 169–176.
132. Guidelines for the development and validation of new potency assays for the evaluation of umbilical cord blood. National Marrow Donor Program

- Advisory Group / S. Spellman, C.K. Hurley, C. Brady [et al.] // *Cytherapy*. – 2011. – Vol. 13. – P. 848–855. – doi: 10.3109/14653249. 2011.571249.
133. Hall K.M. Hematopoietic stem cell potency for cellular therapeutic transplantation, advances in hematopoietic stem cell research / K.M. Hall, H. Harper, I.N. Rich; [Ed. by Rosana Pelayo]. – 2012. – P. 383–406.
134. Harper H. Measure the potency of a stem cell therapeutic / H. Harper, I.N. Rich; [Ed. by I.N. Rich] // *Methods Mol Biol*. – 2015. – Vol. 1235. – P. 33–48. –doi: 10.1007/978-1-4939-1785-3_4.
135. Harris D.T. Non-haematological user of cord blood stem cells / D.T. Harris // *Br J Haematol*. – 2009. – Vol. 147. – P. 177–184.
136. Holland E.J. Management of aniridic keratopathy with keratolimbal allograft: a limbal stem cell transplantation technique / E.J. Holland, A.R. Djalilian, G.S. Schwartz // *Ophthalmology*. – 2003. – Vol. 110. – P. 125–130.
137. Horai R. Cytokines in autoimmune uveitis / R. Horai, R.R. Caspi // *J. Interferon Cytokine Res*. – 2011. – Vol. 31, №10. – P. 734–744.
138. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells / H. Sugiyama, K. Maeda, M. Yamato [et al.] // *J Tissue Eng Regen Med*. – 2008. – Vol. 2. – P. 445–449.
139. Human limbal mesenchymal cells support the growth of human corneal epithelial stem/progenitor cells / M.N. Nakatsu, S. González, H. Mei, S.X. Deng // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2014. – №55. – C. 6953–6959.
140. Human mesenchymal stem cells differentiate into keratocyte-like cells in keratocyte-conditioned medium / S.H. Park, K.W. Kim, Y.S. Chun, J.C. Kim // *Exp Eye Res*. – 2012. – №101. – P. 16–26.
141. Human umbilical cord blood-derived mononuclear cells improve murine ventricular function upon intramyocardial delivery in right ventricular chronic pressure overload / S. Oommen, S. Yamada, S.C. Peral [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2015. – Vol.6. – P. 50. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25890300>.

142. IL-8 and MCP gene expression and production by LPS-stimulated human corneal stromal cells / R.M. Shtein, S.G. Elner, Z.M. Bian, V.M. Elner // International Journal of Inflammation. – 2012. – P. 4. – <http://dx.doi.org/10.1155/2012/714704>.
143. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells / P.S. Cho, D.J. Messina, E.L. Hirsh [et al.] // Blood. – 2008. – Vol. 111. – P. 430–438.
144. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells / W. Oh, D. Kim, Y. Yang, J. Lee // Cell Immunol. – 2008. – Vol. 251. – P. 116–123. – doi: 10.1016/j.cellimm.2008.04.003.
145. Immunomodulatory effect Of umbilical cord derived mesenchymal stem cells / S. Shawki, T. Gaafar, H. Erfan [et al.] // Microbiol Immunol. – 2015. – Vol. 59, №6. – P. 348–356. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25869421>.
146. In sickness and in health: Corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy / M. Notara, A. Alatza, J. Gilfillan [et al.] // Exp Eye Res. – 2010. – Vol. 90. – P. 188–195.
147. In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells towards an endodermal pathway / S. Sensken, S. Wacławczyk, A.S. Knaupp [et al.] // Cytotherapy. – 2007. – Vol. 9. – P. 362–378.
148. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient / A.D. Ebert, J. Yu, F.F. Rose [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 457. – P. 277–280.
149. Induction of corneal epithelium-like cells from cynomolgus monkey embryonic stem cells and their experimental transplantation to damaged cornea / Y. Kumagai, M.S. Kurokawa, H. Ueno [et al.] // Cornea. – 2010. –Vol. 29. – P. 432–438.
150. Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases / M. Mesquida, A. Leszczynska, V. Llorenç, A. Adán // Clin Exp Immunol. – 2014. – Vol. 176, №3. – P. 301–309.
151. Interleukin 17 in various ocular surface inflammatory diseases / M.H. Kang, M.K. Kim, H.J. Lee [et al.] //J. Korean Med. Sci. – 2011.– Vol. 26, №7. – P. 938–944.

152. In vivo expansion of autologous limbal stem cell using simple limbal epithelial transplantation for treatment of limbal stem cell deficiency / I. Lal, B.U. Panchal, S. Basu, V.S. Sangwan // BMJ Case Rep. – 2013. – doi: 10.1136/bcr-2013-009247.
153. Jain A.K. Amniotic membrane transplantation in ocular rosacea / A.K. Jain, J. Sukhija // Ann Ophthalmol (Skokie). – 2007. – Vol. 39. – P. 71–73.
154. Jeganathan V.S. Treatment viability of stem cells in ophthalmology / V.S. Jeganathan, M. Palanisamy // Curr Opin Ophthalmol. – 2010. – Vol. 21, №3. – P. 213–217. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393292>.
155. Jennings M. Xie lab characterizes niche control of stem cell function / M. Jennings, L. Roberts // Cell Stem Cell. – 2008. – <http://www.stowers-institute.org/labs/XieLab.asp>.
156. Joe A.W. Concise review: identifying limbal stem cells: Classical concepts and new challenges / A.W. Joe, S.N. Yeung // Stem Cells Translational Medicine. – 2014. – Vol. 3. – P. 318–322.
157. Jousson A.M. VEGF - dependent conjunctivalization of the corneal surface / A.M. Jousson, V. Ponlaki, N. Mitsiades // Invest. Ophthalmol. Vis.Sci. – 2003. – Vol. 44. – P. 117–123.
158. Joyce N.C. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium / N.C. Joyce, D.L. Harris, V. Markov // Mol Vis. – 2012. – №18. – P. 547–64.
159. Kim H.K. Fibrin glue-assisted augmented amniotic membrane transplantation for the treatment of large noninfectious corneal perforations / H.K. Kim, H.S. Park // Cornea. – 2009. – Vol. 28. – P. 170–176.
160. Kim J.Y. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models / J.Y. Kim // World J Stem Cells. – 2010. – Vol. 2. – P. 34. – doi: 10.4252/wjsc.v2.i2.34.
161. Lam J. Ocular surface disease in posttrabeculectomy/mitomycin C patients / J. Lam, T.T. Wong, L. Tong // Clin Ophthalmol.. – 2015. – Vol. 9. – P. 187–191. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678766>.

162. Lang R. Human corneal epithelial cells express functional PAR-1 and PAR-2 / R. Lang, P.L. Legat // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2003. – Vol. 44. – P. 99–105.
163. Levels of cytokines in umbilical cord blood in relation to spontaneous term labor / E. Tutdibi, A. Hunecke, U. Lindner [et al.] // *J Perinat Med.* – 2012. – Vol. 40. – P. 527–532.
164. Levis H.J. Plastic compressed collagen as a biomimetic substrate for human limbal epithelial cell culture / H.J. Levis, R.A. Brown, J.T. Daniels // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31, №30. – P. 7726–7737. – doi: 10.1016 / j. bio materials.2010.07.012.
165. Lim I.J. Epithelial and mesenchymal stem cells from the umbilical cord lining membrane / I.J. Lim, T.T. Phan // *Cell Transplant.* – 2014. – Vol. 23, №4–5. – P. 497–503. – doi: 10.3727/096368914X678346.
166. Limbal allografting from related live donors for corneal surface reconstruction / S.K. Rao, R. Rajagopal, G. Sitalakshmi, P. Padmanabhan // *Ophthalmology.* – 1999. – Vol. 106. – P. 822–828.
167. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration / P. Rama, S. Matuska, G. Paganoni [et al.] // *N Engl J Med.* – 2010. – Vol. 363. – P. 147–155.
168. Linda E. Cell death independent of caspases: a review / E. Linda, A.E. Frank, G. Giuseppe // *Clin Cancer Res.* – 2005. – №11. – P. 3155–3162.
169. Long-term outcome and prognostic factor analysis for keratolimbal allografts / E.S. Han, W.R. Wee, J.H. Lee [et al.] // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 249. – P. 1697–1704.
170. Loss of corneal epithelial stem cell properties in outgrowths from human limbal explants cultured on intact amniotic membrane / S. Kolli, M. Lako, F. Figueiredo [et al.] // *Regen Med.* – 2008. – Vol. 3. – P. 329–342.
171. Mahaligman S. Expression of the interferon - inducible chemokines Mu Mig and Crg-2 following vaccinia virus infection in vivo / S. Mahaligman, G. Karupich // *Immunol and Cell. Biol.* – 2000. – №2. – P. 156–160.

172. Markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction and the 20-year cumulative incidence of early age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study / R. Klein, C.E. Myers, K.J. Cruickshanks [et al.] // *JAMA Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 132, №4. – P. 446–455.
173. Martin R. Corneal conjunctivalisation in long-standing contact lens wearers / R. Martin // *Clin Exp Optom.* – 2007. – Vol. 90. – P. 26–30.
174. McAlinden C. Corneal refractive surgery: Past to present / C. McAlinden // *Clin Exp Optom.* – 2012. – Vol. 95. – P. 386–398.
175. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells / L.S. Meirelles, A.M. Fontes, D.T. Covas, A.I. Caplan // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – Vol. 20. – P. 419–427.
176. Menzel-Severing J. Stem cell-based therapy for corneal epithelial reconstruction: present and future / J. Menzel-Severing, F.E. Kruse, U. Schlötzer-Schrehardt // *Can J Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 48, №1. – P. 13–21.
177. Mesenchymal stromal cell-like characteristics of corneal keratocytes / P.F. Choong, P.L. Mok, S.K. Cheong, K.Y. Then // *Cytherapy.* – 2007. – Vol. 9. – P. 252–258.
178. Miri A. Long-term outcomes of autolimbal and allolimbal transplants / A. Miri, B. Al-Deiri, H.S. Dua // *Ophthalmology.* – 2010. – Vol. 117, №6. – P. 1207–1213.
179. Modified simple limbal epithelial transplantation using cryopreserved amniotic membrane for unilateral limbal stem cell deficiency / G. Amescua, M. Atallah, N. Nikpoor [et al.] // *American Journal of Ophthalmology.* – 2014. – Vol. 158, №3. – P. 469–475. – doi: 10.1016/j.ajo.2014.06.002.
180. Mohsenin A. Ocular manifestations of systemic inflammatory diseases / A. Mohsenin, J.J. Huang // *Conn. Med.* – 2012. – Vol. 76, №9. – P. 533–544.
181. Nakamura T. New hopes and strategies for the treatment of severe ocular surface disease / T. Nakamura, S. Kinoshita // *Curr Opin Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 274–278.
182. Neurotrophic Keratitis / F. Semeraro, E. Forbice, V. Romano [et al.] //

Ophthalmologica. – 2014. – Vol. 231, №4. – P. 191–197.

183. Nguyen P. Ocular surface reconstruction: recent innovations, surgical candidate selection and postoperative management / P. Nguyen, S.C. Yiu // Expert Review of Ophthalmology. – 2008. – Vol. 3, №5. – P. 567–584. doi: 10.1586/17469899.3.5.567.

184. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus / W. Li, Y. Hayashida, Y.T. Chen [et al.] // Cell Res. – 2007. – Vol. 17. – P. 26–36.

185. Normal development of refractive state and ocular dimensions in guinea pigs / X. Zhou, J. Qu, R. Xie [et al.] // Vision Res. – 2006. – Vol. 46. – P. 2815–2823.

186. Oie Y. Regenerative medicine for the cornea / Y. Oie, K. Nishida // BioMed Research International. – 2013. – doi: 10.1155/2013/428247.

187. Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units / F. Mancinelli, A. Tamburini, A. Soagnoli [et al.] // Transplant Proc. – 2006. – Vol. 38. – P. 1174–1176.

188. Oral mucosal graft with amniotic membrane transplantation for total limbal stem cell deficiency / J. Liu, H. Sheha, Y. Fu [et al.] // Am J Ophthalmol. – 2011. – Vol. 152, №5. – P. 739–747.

189. Ordonez P. Limbal epithelial stem cells: Role of the niche microenvironment / P. Ordonez, N. Di Girolamo // Stem Cells. – 2012. – Vol. 30. – P. 100–107.

190. Osei-Bempong C. The limbal epithelium of the eye – a review of limbal stem cell biology, disease and treatment / C. Osei-Bempong, F.C. Figueiredo, M. Lako // BioEssays. – 2013. – Vol. 35. – P. 211–219.

191. Park Y.M. Microbiological study of therapeutic soft contact lenses used in the treatment of recurrent corneal erosion syndrome / Y.M. Park, H.J. Kwon, J.S. Lee // Eye Contact Lens. – 2015. – Vol. 41, №2. – P.84–86. – doi: 10.1097/ICL.0000000000000068.

192. PEDF promotes self-renewal of limbal stem cell and accelerates corneal epithelial wound healing / T.C. Ho, S.L. Chen, J.Y. Wu [et al.] // Stem Cells. –

2013. – Vol. 31. – P. 1775–1784.

193. Perdigoto C.N. Sending the right signal: Notch and stem cells / C.N. Perdigoto, A.J. Bardin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830, №2. – P. 2307–2322.

194. Pflugfelder S.C. Immunoregulation on the ocular surface: 2nd Cullen Symposium / S.C. Pflugfelder, M.E. Stern // *Ocul Surf.* – 2009. – Vol. 7, №2. – P. 67–77.

195. Pinnamaneni N. Concise review: Stem cells in the corneal stroma / N. Pinnamaneni, J.L. Funderburgh // *Stem cells.* – 2012. – №30. – P. 1059–1063.

196. Plasma polymer-coated contact lenses for the culture and transfer of corneal epithelial cells in the treatment of limbal stem cell deficiency / D.K. Brown, S. Low, M. Indumathi [et al.] // *Tissue Eng Part A.* – 2014. – №20. – P. 646–655.

197. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects / S. López-Plandolit, M.C. Morales, V. Freire [et al.] // *Cornea.* – 2010. – Vol. 29, №8. – P. 843–848.

198. Pope B. Effect of umbilical cord blood prefreeze variables on postthaw viability / B. Pope, B. Hokin, R. Grant // *Transfusion.* – 2014. – Vol. 55, №3. – P. 629–635. – doi:10.1111/trf.12873.

199. Proteomic analysis of potential keratan sulfate, chondroitin sulfate A, and hyaluronic acid molecular interactions / A.H. Conrad, Y. Zhang, E.S. Tasheva, G. W. Conrad // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2010. – №51. – P. 4500–4515.

200. Pyle A.D. Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival / A.D. Pyle, L.F. Lock, P.J. Donovan // *Nat Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 344–350.

201. Qualitative and quantitative cell recovery in umbilical cord blood processed by two automated devices in routine cord blood banking: a comparative study / P. Selves, D. Planelles, V. Mirabet [et al.] // *Blood Transfus.* – 2013. – №11. – P. 405–411.

202. Quality of long-term cryopreserved umbilical cord blood units for hematopoietic cell transplantation / S. Yamamoto, H. Ikeda, D. Toyama [et al.] // *Int J Hematol.* – 2011. – Vol. 93. – P. 99–105.
203. Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma / S. Querol, S.G. Gomez, A. Pagliuca [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2010. – Vol. 50. – P. 265.
204. Quantitative proteome analysis of pluripotent cells by iTRAQ mass tagging reveals post-transcriptional regulation of proteins required for ES cell self-renewal / R.N. O'Brien, Z. Shen, K. Tachikawa [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2010. – №9. – P. 2238–2251.
205. Randomized controlled study of ocular lubrication versus bandage contact lens in the primary treatment of recurrent corneal erosion syndrome / M.A. Ahad, M. Anandan, V. Tah [et al.] // *Cornea.* – 2013. – №32. – P. 1311–1304.
206. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cell / Y. Ma, Y. Xu, Z. Xiao [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24, №2. – P. 315–332.
207. Reconstruction of corneal epithelium with cryopreserved corneal limbal stem cells in a goat model / S. Mi, X. Yang, Q. Zhao [et al.] // *Mol Reprod Dev.* – 2008. – Vol. 75, № 11. – P. 1607–1616.
208. Reduced availability of potential cornea donors: reasons and suggestions / K. Rosenbaum, J. Rottler, R. Steinbach, K.K. Huber // *Klin Monatsbl Augenheilkd.* – 2010. – Vol. 227. – P. 418–422.
209. Regenerative Medicine of the eye: a short review / D.T. Harris, X. He, M. Badowski, J.C. Nicols; [Ed. by N. Levicar, N.A. Habib, I. Dimarakis, M.Y. Gordon] // *Stem cell repair & regeneration.* – London: Imperial College Press, 2008. – Vol. 3. – P. 211–225.
210. Results of a phase I/II clinical trial: standardized, non-xenogenic, cultivated limbal stem cell transplantation / N. Zakaria, T. Possemiers,

- S. Dhubhghaill [et al.] // Journal of Translational Medicine. – 2014. – Vol. 12. – P. 58. – doi: 10.1186/1479-5876-12-58.
211. Rich I.N. Potency, proliferation and engraftment potential of stem cell therapeutics: The relationship between potency and clinical outcome for hematopoietic stem cell products / I.N. Rich // J Cell Sci Ther. – 2013. doi: 10.4172/2157-7013.S13-001.
212. Rich I.N. Tissue engineering: Propagation and potency evaluation. In: Translational regenerative medicine / I.N. Rich; [Ed. by A. Atala]. – Elsevier, 2015. – P. 117–124. – doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00010-4.
213. Rocha V. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells / V. Rocha, E. Gluckman // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2006. – Vol. 12. – Suppl. 1. – P. 34–41.
214. Role of amniotic membrane transplantation in acute chemical injury / K. Lo, S. Kohanim, D. Trief, J. Chodosh // Int Ophthalmol Clin. – 2013. – Vol. 53, №4. – P. 33–41.
215. Rubinstein P. Why Cord Blood? / P. Rubinstein // Human Immunology. – 2006. – Vol. 67. – P. 398–404.
216. Sangwan V.S. Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders / V.S. Sangwan // Indian J Ophthalmol. – 2007. – Vol. 55. – P. 251–260.
217. Sauder G. Limbal stem cell deficiency after subconjunctival mitomycin C injection for trabeculectomy / G. Sauder, J.B. Jonas // Am J Ophthalmol. – 2006. – Vol. 141. – P. 1129–1130.
218. Sejpal K. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency / K. Sejpal, P. Bakhtiari, S.X. Deng // Middle East Afr J Ophthalmol. – 2013. – Vol. 20, №1. – P. 5–10. – doi: 10.4103/0974-9233.106381.
219. Shimmura S. Surgical treatment of limbal stem cell deficiency: are we really transplanting stem cells? / S. Shimmura, K. Tsubota // Am J Ophthalmol. – 2008. – Vol. 146. – P. 154–155.

220. Shortt A.J. Corneal stem cells in the eye clinic / A.J. Shortt, S.J. Tuft, J.T. Daniels // *British Medical Bulletin*. – 2011. – Vol. 100, №1. – P. 209–225. – doi: 10.1093/bmb/ldr041.
221. Sloper C.M. Tacrolimus (FK506) in the management of high-risk corneal and limbal grafts / C.M. Sloper, R.J. Powell, H.S. Dua // *Ophthalmology*. – 2001. – Vol. 108. – P. 1838–1844.
222. Small-molecule induction promotes corneal epithelial cell differentiation from human induced pluripotent stem cells / A. Mikhailova, T. Ilmarinen, H. Uusitalo [et al.] // *Stem Cell Reports*. – 2014. – №2. – P. 219–231.
223. Soni N.G. Blood-derived topical therapy for ocular surface diseases / N.G. Soni, B.H. Jeng // *Br J Ophthalmol*. – 2015. – doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-306842.
224. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas / S.L. McGowan, H.F. Edelhauser, R.R. Pfister, D.R. Whikehart // *Mol Vis*. – 2007. – Vol. 13. – P. 1984–2000.
225. Stem cell therapies for ocular surface disease / S. Ahmad, S. Kolli, M. Lako [et al.] // *Drug Discov Today*. – 2010. – Vol. 15. – P. 306–313.
226. Stem cell therapy for retinal disease / M.D. Tibbetts, M.A. Samuel, T.S. Chang [et al.] // *Curr Opin Ophthalmol*. – 2012. – Vol. 23. – P. 226–234.
227. Successful application of ex vivo expanded human autologous oral mucosal epithelium for the treatment of total bilateral limbal stem cell deficiency / S. Kolli, S. Ahmad, H.S. Mudhar [et al.] // *Stem Cells*. – 2014. – Vol. 32, №8. – P. 2135–2146. – doi: 10.1002/stem.1694.
228. Suitability of human Tenon's fibroblasts as feeder cells for culturing human limbal epithelial stem cells / G. Scafetta, E. Tricoli, C. Siciliano [et al.] // *Stem Cell Rev*. – 2013. – Vol. 9. – P. 847–857.
229. Targeted transplantation of human umbilical cord blood endothelial progenitor cells with immunomagnetic nanoparticles to repair corneal endothelium defect / C. Shao, J. Chen, P. Chen [et al.] //

Stem Cells Dev. – 2015. – Vol. 24, №6. – P. 756–767. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315152>.

230. The fate of limbal epithelial progenitor cells during explant culture on intact amniotic membrane / W. Li, Y. Hayashida, H. He [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2007. – Vol. 48. – P. 605–613.

231. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro / M. Wang, Y. Yang, D. Yang [et al.] // Immunology. – 2009. – Vol. 126. – P. 220–232. – doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02891.x.

232. The impact of intrapartum factors on umbilical cord blood stem cell banking / U. Aufderhaar, W. Holzgreve, E. Danzer [et al.] // J Perinat Med. – 2003. – Vol. 31. – P. 317–322.

233. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation / V.H. Nguyen, S. Shashidhar, D.S. Chang [et al.] // Blood. – 2008. – Vol. 111. – P. 945–953.

234. The safety of photochemical tissue bonding for treating damaged corneal epithelium using limbal stem cells pre-cultured on human amniotic membrane / C. Gu, M. Yao, J. Yang [et al.] // J Photochem Photobiol B. – 2015. – Vol. 148. – P. 59–65. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889946>.

235. The use of an IL-1 receptor antagonist peptide to control inflammation in the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency / E. Fok, Y.H. Martin, A.L. Guildford, S.R. Sandeman // Biomed Res Int. – 2015. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25705668>.

236. Therapeutic potential of human umbilical cord derived stem cells in a rat myocardial infarction model / K.H. Wu, B. Zhou, C.Y. Yu [et al.] // Ann. Thorac. Surg. – 2007. – Vol. 83. – P. 1491–1500.

237. Thoft R.A. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance / R.A. Thoft, J. Friend // Invest. Ophthalmol. Vis. Sei. – 1983. – Vol. 24. – P. 1442–1443.

238. Three-year outcomes of cultured limbal epithelial allografts in aniridia

and Stevens-Johnson syndrome evaluated using the clinical outcome assessment in surgical trials assessment tool / A.J. Shortt, C. Bunce, H.J. Levis [et al.] // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2014. – Vol. 3. – P. 265–275.

239. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. / L. Calderón, T. Boehm, S. Thein [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – №108. – P. 7517–7522.

240. Tolar J. Immune regulatory cells in umbilical cord blood: T regulatory cells and mesenchymal stromal cells / J. Tolar, K.L. Hippen, B.R. Blazar // *Br J Haematol*. – 2009. – Vol. 147, №2. – P. 200–206.

241. Topical mitomycin C chemotherapy in the management of ocular surface neoplasia: A 10-year review of treatment outcomes and complications / H.C. Russell, V. Chadha, D. Lockington, E.G. Kemp // *Br J Ophthalmol*. – 2010. – Vol. 94. – P. 1316–1321.

242. Transcription factor TCF4 maintains the properties of human corneal epithelial stem cells / R. Lu, Y. Qu, J. Ge [et al.] // *Stem Cells*. – 2012. – Vol. 30. – P. 753–761.

243. Transforming ocular surface stem cell research into successful clinical practice / V.S. Sangwan, R. Jain, S. Basu [et al.] // *Indian Journal of Ophthalmology*. – 2014. – Vol. 62, №1. – P. 29–40. – doi: 10.4103/0301-4738.126173.

244. Transplantation of conjunctival epithelial cells cultivated ex vivo in patients with total limbal stem cell deficiency / J.R. Ricardo, P.C. Cristovam, P.A. Filho [et al.] // *Cornea*. – 2013. – Vol. 32, №3. – P. 221–228.

245. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results / A.J. Shortt, G.A. Secker, M.D. Notara [et al.] // *Survey of Ophthalmology*. – 2007. – Vol. 52, №5. – P. 483–502. – doi: 10.1016/j.survophthal.2007.06.013.

246. Tseng S.C. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells / S.C. Tseng // *Mol. Biol. Rep.* – 1996. – Vol. 23. – P. 47–58.

247. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulation cells in human clinical transplantation / H.E. Broxmeyer, J. Kurtzberg, E. Gluckman [et al.] // *Criobiology*. – 1995. – Vol. 32, №6. – P. 511–515.
248. Umbilical cord blood serum therapy for the management of persistent corneal epithelial defects / E. Erdem, M. Yagmur, I. Harbiyeli [et al.] // *Int J Ophthalmol.* – 2014. – №7. – C. 807–810
249. Unrelated cord blood transplantation in children with sickle cell disease: Review of four-center experience / T.V. Adamkiewicz, P. Szabolcs, A. Haight [et al.] // *Pediatr Transplantation*. – 2007. – Vol. 11. – P. 641–644.
250. Use of amniotic membrane and autologous serum eye drops in Mooren's ulcer / P. Lavaju, M. Sharma, A. Sharma, S. Chettri // *Nepal J Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 5, №9. – P. 120–123.
251. Utheim T.P. The culture of limbal epithelial cells / T.P. Utheim, T. Lyberg, S. Raeder // *Methods Mol Biol.* – 2013. – Vol. 1014. – P. 103–129. – doi: 10.1007/978-1-62703-432-6_7.
252. Vantieghem G. Neuroparalytic keratopathy as the first sign of a cerebral meningioma / G. Vantieghem, P.C. Maudgal // *Bull Soc Belge Ophtalmol.* – 2007. – Vol. 303. – P. 81–86.
253. Vascular endothelial growth factor inhibitors for treatment of corneal neovascularization: a meta-analysis / M. Papathanassiou, S. Theodoropoulou, A. Analitis [et al.] // *Cornea*. – 2013. – Vol. 32, №4. – P. 435–444.
254. Vignali D.A.A. How regulatory T cells work / D.A.A. Vignali, L.W. Collison, C.J. Workman // *Nat Rev Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 523–532.
255. Visual improvement after cultivated oral mucosal epithelial transplantation / C. Sotozono, T. Inatomi, T. Nakamura [et al.] // *Ophthalmology*. – 2013. – Vol. 120, №1. – P. 193–200. – doi: 10.1016/j.opthta.2012.07.053.
256. Wallace V.A. Stem cells: a source for neuron repair in retinal disease / V.A. Wallace // *Can. J. Ophtalmol.* – 2007. – №42. – P. 442–446.

257. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina / M. Takahashi, T.D. Palmer, J. Takahashi [et al.] // *Mol. Cell Neurosci.* – 1998. – №12. – P. 340–348.
258. Wnt/ β -catenin signaling regulates proliferation of human cornea epithelial stem/progenitor cells / M.N. Nakatsu, Z. Ding, M.Y. Ng [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – Vol. 52. – P. 4734–4741.
259. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future / S. Yamanaka // *Cell Stem Cell.* – 2012. – Vol. 10. – P. 678–684.
260. Yoon K.C. Use of umbilical cord serum in ophthalmology / K.C. Yoon // *Chonnam Med J.* – 2014. – Vol. 50, №3. – P. 82–85. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25568842>.
261. Zarei-Ghanavati S. Topical interferon alpha-2b for treatment of noninvasive ocular surface squamous neoplasia with 360° limbal involvement / S. Zarei-Ghanavati, R. Alizadeh, S.X. Deng // *J. Ophthalmic Vis Res.* – 2014. – Vol. 9, №4. – P. 423–426. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25709765>.
262. Zhao M. Immunohistochemistry studies on the thermal burn of cornea in rats / M. Zhao, J. Chen, P. Yang // *Yan Ke Xue Bao.* – 1997. – Vol. 13, №2. – P. 70–74.
263. Zhao Y. Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics / Y. Zhao, H. Wang, Th. Mazzone // *Experimental Cell Research.* – 2006. – №312. – P. 2454–2464.
264. Zhao Y. Systematic review and meta-analysis on transplantation of ex vivo cultivated limbal epithelial stem cell on amniotic membrane in limbal stem cell deficiency / Y. Zhao, L. Ma // *Cornea.* – 2015. – Vol. 34, №5. – P. 592–600. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789694>.