

DOI: 10.15825/1995-1191-2023-4-160-173

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРА ДЛЯ ВЫКРАИВАНИЯ ЛИМБАЛЬНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ РОГОВИЦЫ

О.Н. Нефедова¹, Б.Э. Малюгин^{1, 2}, С.А. Борзенко^{1, 2}, М.Ю. Герасимов¹,
Д.С. Островский¹, А.В. Шацких¹

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель: в эксперименте *in vitro* изучить выживаемость и сохранность пролиферативной активности лимбальных стволовых клеток (ЛСК) в фрагментах ткани лимба, выкроенных фемтосекундным лазером (ФСЛ). **Материалы и методы.** Из донорских кадаверных глаз ($n = 8$) в верхней и нижней частях лимба, содержащих наибольшее количество лимбальных стволовых клеток, фемтосекундным лазером модели Z8 (Ziemer, Швейцария) формировали лимбальные фрагменты, которые фрагментировали на 4 мини-трансплантата с применением разных уровней энергии (100, 110, 120%). Контролем служили мини-трансплантаты из симметричных участков кадаверных глаз, которые выделяли мануально при помощи микрохирургического лезвия. Культивирование мини-трансплантатов проводили на протяжении двух недель в культуральных средах, предназначенных для лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК) (EpiLife (0,06 мМ Ca^{++})) и для мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) (DMEM/F12) с добавлением специфических факторов роста с целью избирательного стимулирования ЛЭСК или ММСК соответственно. Фенотип полученных культивированных клеток в группах «лазер» и «нож» определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора маркеров к мембранным белкам ЛЭСК и ММСК: CD166, CD105, CD90, CD29, CD34. Способность культивированных клеток к адгезии и пролиферации в группах «лазер» и «нож» определяли путем посева третьего пассажа полученных культур на Боуменову мембрану бесклеточных роговиц. **Результаты.** Первичную культуру клеток получили из мини-трансплантатов всех доноров в обеих группах. Морфология клеток соответствовала фенотипу эпителиальных клеток роговицы (паттерн по типу «булыжной мостовой»). При культивировании в среде EpiLife (0,06 мМ Ca^{++}) определили наличие пролиферации ЛСК из 38,6% мини-трансплантатов, в среде DMEM/F12 (1 : 1) – из 31,8%. Через две недели выход клеток из мини-трансплантатов в группах «лазер» и «нож» составил 77,2 и 63,6% соответственно. Рост клеток к концу второй недели культивирования мини-трансплантатов, полученных ФСЛ на энергиях 120, 110 и 100%, составил соответственно 87,5; 71,4 и 71,4%. Было установлено, что полученные культуры клеток в группах «лазер» и «нож» и подгруппах «120%», «110%» и «100%» фенотипически не отличались. Анализ методом цитофлуориметрии показал, что культуры клеток в группах имели смешанный паттерн экспрессии маркеров как ЛЭСК (CD29+), так и ММСК (CD90+, CD105+). Посев третьего пассажа культуры клеток в исследуемых группах во всех случаях продемонстрировал адгезию и формирование на Боуеновой мембране модельных роговиц монослоя клеток. **Заключение.** Применение ФСЛ для выкраивания лимбальных трансплантатов представляется нам эффективным и безопасным по сравнению с традиционной механической (ножевой) методикой. Культуры клеток, полученные из мини-трансплантатов, выкроенных ФСЛ, были способны к росту и миграции на протяжении как минимум 21 суток.

Ключевые слова: лимбальные стволовые клетки, бесклеевая простая лимбальная эпителиальная трансплантация, синдром лимбальной недостаточности, фемтосекундный лазер.

Для корреспонденции: Нефедова Ольга Николаевна. Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а. Тел. (915) 489-59-15. E-mail: dr.olganefedova@gmail.com

Corresponding author: Olga Nefedova. Address: 59a, Beskudnikovskiy Bul'var, Moscow, 127486, Russian Federation. Phone: (915) 489-59-15. E-mail: dr.olganefedova@gmail.com

SAFETY ASSESSMENT OF THE FEMTOSECOND LASER IN CORNEAL LIMBAL GRAFT EXCISION

O.N. Nefedova¹, B.E. Malyugin^{1, 2}, S.A. Borzenok^{1, 2}, M.Yu. Gerasimov¹, D.S. Ostrovsky¹, A.V. Shatskikh¹

¹ Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

² Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Objective: to study *in vitro* survival and preservation of the proliferative activity of limbal stem cells (LSCs) in femtosecond laser-cut limbal tissue fragments. **Materials and methods.** Limbal fragments were formed from donor cadaver eyes (n = 8) in the upper and lower limbus containing the highest number of limbal stem cells, using a Z8 femtosecond laser (FSL) (Ziemer, Switzerland). The limbal fragments were fragmented into 4 mini-grafts using different energy levels (100, 110, 120%). Mini-grafts from symmetrical sections of the cadaver eyes, which were manually isolated using a microsurgical blade, served as controls. The mini-grafts were cultured for two weeks in culture media intended for limbal epithelial stem cells (LESCs) (EpiLife (0.06 mM Ca⁺⁺)) and for multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) (DMEM/F12), with the addition of specific growth factors to selectively stimulate LESCs or MMSCs, respectively. The phenotype of the obtained cultured cells in the «laser» and «knife» groups was determined by flow cytometry using a set of markers (CD166, CD105, CD90, CD29, CD34) for the membrane proteins of LESCs and MMSCs. The ability of cultured cells to adhesion and proliferation in the «laser» and «knife» groups was determined by seeding the third passage of the resulting cultures on Bowman's membrane of acellular corneas. **Results.** Primary cell culture was obtained from mini-grafts of all donors in both groups. Cell morphology was consistent with the phenotype of corneal epithelial cells (cobblestone pattern). When cultured in the EpiLife medium (0.06 mM Ca⁺⁺), we determined the presence of LSCs proliferation from 38.6% of mini-grafts; in the DMEM/F12 medium (1 : 1) the presence was determined from 31.8%. Two weeks later, cell yield from mini-grafts in the «laser» and «knife» groups was 77.2% and 63.6%, respectively. Cell growth by the end of week 2 of culturing of mini-grafts obtained by FSL at 120, 110 and 100% energies was 87.5, 71.4 and 71.4%, respectively. It was found that the resulting cell cultures in the «laser» and «knife» groups and in the «120%», «110%» and «100%» subgroups were not different phenotypically. Cytofluorimetric analysis showed that cell cultures in the groups had a mixed pattern of marker expression of both LESCs (CD29+) and MMSCs (CD90+, CD105+). Seeding of the third passage of cell culture in the test groups in all cases demonstrated adhesion and formation of a cell monolayer on the Bowman's membrane of model corneas. **Conclusion.** The use of FSL for cutting out limbal grafts seems to be effective and safe in comparison with the traditional mechanical (knife) technique. Cell cultures obtained from FSL-cut mini-grafts were able to grow and migrate for at least 21 days.

Keywords: limbal stem cells, glueless simple limbal epithelial transplantation, limbal stem cell deficiency, femtosecond laser.

ВВЕДЕНИЕ

Прозрачность роговицы обеспечивается рядом факторов, среди которых одним из важнейших является эпителиальный слой, играющий роль барьера, отграничивающего роговицу как от внешней среды, так и от распространения на нее конъюнктивального эпителия. Эпителий роговицы постоянно обновляется за счет непрерывного функционирования лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК). Вектор движения клеток направлен от Боуменовой мембраны к поверхности роговицы и от ее периферии к центру [1]. ЛЭСК расположены в лимбе, представляющем собой сложную микро-анатомическую структуру [2]. Пролиферация, миграция и дифференцировка ЛЭСК зависят от их особого микроокружения, называемого лимбальной нишей. Помимо клеток-предшественников лимбального эпителия в лимбальной нише располагаются мезенхимальные мультипотентные стволовые клетки (ММСК), ме-

ланоциты, иммунные клетки, сосудистые и нервные клетки, внеклеточный матрикс и сигнальные молекулы (факторы роста и цитокины) [3–8].

Различная патология, затрагивающая какой-либо компонент лимбальной ниши, может привести к дисфункции лимбальных стволовых клеток (ЛСК), и соответственно, к развитию синдрома лимбальной недостаточности (СЛН) [7,9,10]. Причины развития данного состояния могут быть первичными, вызванными генетическими дефектами (врожденная аниридия, аномалия Петерса), системными иммуноопосредованными заболеваниями (синдром Стивенса–Джонсона, глазной рубцовый пемфигоид) и приобретенными – вследствие травм или хронических воспалительных процессов (химические и термические ожоги, хронические длительные кератиты и кератоконъюнктивиты, нейротрофические и буллезные кератопатии, токсико-аллергические реакции, опухоли глазной поверхности и др.) [11].

В зависимости от объема повреждения лимбальной зоны выделяют полный и неполный СЛН. В зависимости от вовлеченности каждого глаза в данный патологический процесс выделяют двусторонний или односторонний СЛН [12].

Наиболее перспективным и безопасным вариантом лечения одностороннего СЛН (полного и неполного), получившим наиболее широкое распространение в мире, является «простая трансплантация лимбального эпителия», или SLET (simple limbal epithelial transplantation, англ.), описанная в 2012 году V. Sangwan et al. [12, 13]. Для этой технологии необходимо выделить участок верхнего лимба роговицы размерами 2×2 мм из здорового глаза и, разделив его при помощи микрохирургического лезвия на несколько (8–12) фрагментов, приклеить их фибриновым клеем к амниотической мембране, наложенной поверх заранее подготовленной стромы роговицы поврежденного глаза [13]. Поскольку берется относительно малый объем лимбальной ткани глаза-донора, риск развития ятрогенного СЛН здорового глаза сведен к минимуму. Эффективность данной операции составляет 80% и более у взрослых пациентов и 71,2% у детей [14].

Методика «бесклеевой простой лимбальной эпителиальной трансплантации», или G-SLET (glueless simple limbal epithelial transplantation, англ.), была предложена в качестве альтернативы технологии SLET и не предусматривает применения фибринового клея [15]. После удаления фиброваскулярного паннуса с поверхности поврежденного глаза фиксация полученных лимбальных лоскутов происходит за счет размещения их в туннелях, сформированных на периферии стромы роговицы. Таким образом, формируется своеобразное «депо» лимбальных стволовых клеток, расположенное в периферической части роговицы [15].

Следует отметить, что как в технологии SLET, так и G-SLET, все манипуляции по выкраиванию и фрагментации лимбального трансплантата проводятся вручную, механически, с использованием микрохирургических инструментов (расслаиватель, одно-разовое недозированное металлическое лезвие или дозированный алмазный нож, микропинцет) [12, 13]. При этом сложно добиться равномерности лимбального лоскута на всем его протяжении, а качество полученных трансплантатов зависит от опыта хирурга и сложно стандартизируемо. При отсутствии методов контроля глубины выполняемого реза слишком поверхностное или неравномерное расслаивание может существенно ограничить получение достаточного объема ЛСК для успешной реконструкции эпителия роговицы. Этап фрагментации лимбального трансплантата и последующие манипуляции с ним, в частности компрессия пинцетом, могут привести к повреждению и даже гибели части ЛСК. Перенос

недостаточного количества ЛСК может существенно снизить эффективность операции.

Внедрение в практику фемтосекундных лазерных технологий рассеечения тканей, обеспечивающих формирование равномерных и дозированных резов, а также установок, имеющих в своем интерфейсе высокоточные системы визуализации на основе оптической когерентной томографии (ОКТ), представляет собой крайне актуальное и перспективное направление в офтальмохирургии. С нашей точки зрения, применение ФСЛ имеет реальный потенциал получения полноценного лимбального трансплантата с обеспечением полного захвата ниши ЛСК с ее микроокружением и минимальным повреждением в сравнении с механическим способом. В доступной литературе нами не было найдено информации о применении ФСЛ для технологии SLET, а также статей, изучающих влияние лазерной энергии на выживаемость ЛСК после выделения лимба роговицы лазером, что послужило основанием для проведения данного исследования.

Целью исследования стало изучение в эксперименте *in vitro* выживаемости и сохранения пролиферативной активности лимбальных стволовых клеток в фрагментах ткани лимба, выкроенных фемтосекундным лазером.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Получение лимбальных трансплантатов, содержащих ЛСК

Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из кадаверных донорских глаз человека, проводили в соответствии с законодательными и нормативно-правовыми документами РФ. В качестве источника ЛСК использовали лимбальные трансплантаты глазных яблок ($n = 8$) посмертных доноров мужского пола ($n = 4$) в возрасте 55,3 года (32–71 год), предоставленные Глазным тканевым банком ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, после выполнения инфекционного скрининга и де-контаминации 10% раствором повидон-йода (ЭГИС, Венгрия) согласно Алгоритму подготовки донорского трупного роговичного материала в Глазном тканевом банке (ГТБ) [16]. Очистку от эпителия роговицы и удаление остаточных тканей у лимба не проводили. Для эксперимента использовали донорские роговицы, не пригодные для трансплантации в клинику по причине низкой плотности эндотелия либо дефектов стромы. Время от момента констатации биологической смерти до выделения тканевых фрагментов составило $18,8 \pm 0,5$ часа.

Получение лимбальных трансплантатов производили в условиях операционного блока с соблюдением всех правил асептики и антисептики. Глазные яблоки

закрепляли в стерильном механическом держателе. Верхний участок лимба роговицы определяли по остаткам верхней прямой мышцы, проводили разметку. Лимбальные лоскуты выкраивали с использованием ФСЛ в меридиане с 12 до 2 и с 4 до 6 часов условного циферблата (опыт) на уровнях энергии, равных 100, 110 и 120% (высокочастотный низкоэнергетический ФСЛ (нДж), глубина горизонтального реза 200 мкм), после чего в меридиане с 10 до 12 и от 6 до 8 часов выкраивание лимбальных лоскутов производили вручную дозированным алмазным ножом и ножом-расслаивателем (контроль) (рис. 1). Между двумя разными по методу получения образцами лимбальных трансплантатов оставляли интактный участок лимба (перемычку) протяженностью 1,0 мм.

Методика формирования лимбальных фрагментов заключалась в следующем: лимбальный трансплантат длиной 2,0 мм, шириной 1,5 мм фрагментировали на 4 равные части (мини-трансплантаты) (рис. 1). В области верхней и нижней части лимба каждого глаза слева выкраивание лимбального трансплантата производили механически с использованием микрохирургических инструментов (контроль). Для этого по разметке в верхнем и нижнем лимбе выполняли резы алмазным ножом на глубину 200 мкм, что, по нашим оценкам, является оптимальным для полноценного захвата лимбальной ниши с ее микроокружением. После формирования контура, используя нож-расслаиватель, лимбальный трансплантат отделяли от подлежащих тканей. Далее его аккуратно переносили на полимерную подложку и разделяли стальным микрохирургическим одноразовым лезвием на 4 равные части (мини-трансплантаты). В правой части лимба (как сверху, так и снизу) формирование лимбального трансплантата и его одномоментное деление на 4 части производили с использованием ФСЛ. Для этого после аппланации рукоятки лазера к кадаверному глазу позиционировали траектории реза, а оценку глубины горизонтального реза контролировали встроенной системой оптической когерентной томографии (ОКТ). Время работы лазера для формирования одного лимбального трансплантата с его фрагментацией составляло 40 секунд. Для оценки влияния на рост ЛСК разной по величине энергии ФСЛ выкраивание лимбальных трансплантатов производили на разных глазах с разными уровнями энергии (100, 110 и 120%). Выбранные уровни были определены, исходя из проведенных нами ранее исследований различных величин энергии на формируемые фрагменты. Всего в ходе эксперимента было получено 128 мини-трансплантатов (рис. 2).

Полученные мини-трансплантаты помещали в заранее подготовленные стерильные микроцентрифужные пробирки с 500 мкл раствора для хранения роговицы (РУ ФСР № 2010106650, ООО «НЭП «Микрохирургия глаза», Россия). Далее маркированные



Рис. 1. Схема выкраивания лимбальных мини-трансплантатов из донорской роговицы

Fig. 1. Schematic of limbal mini-graft excision from donor cornea

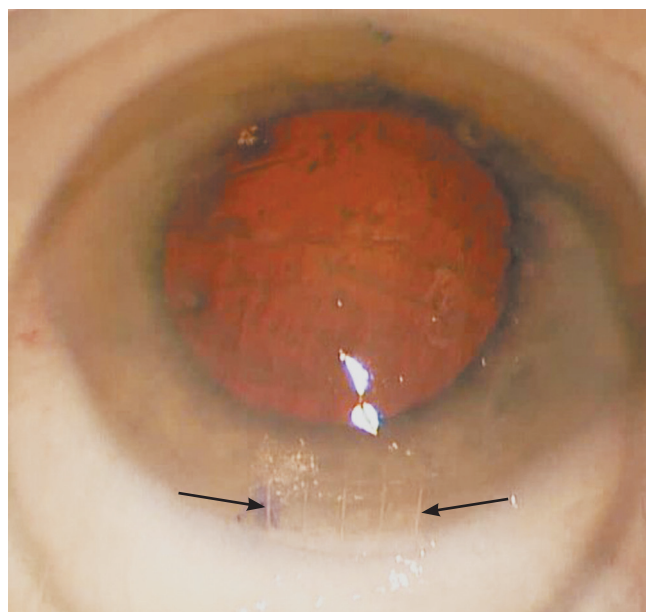


Рис. 2. Фото донорского глаза после выкраивания лимбальных мини-трансплантатов с помощью фемтосекундного лазера. Видны 4 мини-трансплантата, боковые границы разрезов лазера указаны стрелками

Fig. 2. Photo of the donor eye after cutting out limbal mini-grafts with a femtosecond laser. Four mini-grafts are visible, the lateral borders of the laser incisions are indicated by arrows

пробирки помещали в контейнер и транспортировали в лабораторию на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (ЦМБП) головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова».

Культивирование роговичных лимбальных мини-трансплантатов

Эксперименты по культивированию мини-трансплантатов выполняли в лаборатории ЦМБП в сте-

рильных условиях *in vitro*. Культивирование проводили в стандартных условиях, а именно при +37 °C, 100% влажности и 5% концентрации CO₂ (инкубатор NU-5510 NuAire, США). Для этого каждый полученный мини-трансплантат помещали в отдельную лунку 48-луночного планшета (#30048, SPL Lifesciences, Корея) эпителиальной частью вверх, добавляли по 40 мкл культуральной среды и переносили в CO₂-инкубатор; через 2 часа добавляли еще по 100 мкл среды. Спустя сутки использовали нормативный объем среды (по 500 мкл на лунку). Смену среды проводили каждые 2–3 дня.

Культивирование проводили в двух средах до 3-го пассажа. Для стимулирования роста ЛЭСК использовалась среда EpiLife с 0,06 mM Ca⁺⁺ (MEPICFPRF500, Gibco, США), с добавлением антибиотика-антимикотика (A5955, Sigma Aldrich, США): 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В, 5% фетальной бычьей сыворотки (SH30109.03, HyClone Laboratories, США), 5 мкг/мл инсулина растворимого человеческого генно-инженерного короткого действия (Хумулин Регуляр, Эли Лилли энд Компани, США), 5 мкг/мл гидрокортизона («Фармак», Украина) и 10 нг/мл человеческого рекомбинантного эпидермального фактора роста (чЭФР) (ФР-08000, «ПанЭко», Россия) [17, 18]. Другую часть образцов культивировали в среде для ММСК лимба на основе DMEM/F12 с 1,05 mM Ca⁺⁺ (D6421, Sigma Aldrich, США) с добавлением аналогичных компонентов [17, 18].

По достижении клетками 80–90% конфлюентности осуществляли пассирование культуры с использованием фермента аккутазы (StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent, A1110501, Gibco, США). Для этого из каждой лунки удаляли культуральную среду, добавляли и удаляли 300 мкл фермента для очистки от дебриса. Затем повторно добавляли 300 мкл аккутазы и помещали в CO₂-инкубатор при 37 °C на 10 минут. Суспензию клеток собрали в 15 мл центрифужную пробирку, осаждали в течение 5 минут при 200 g при комнатной температуре, и ресуспендировали в 1 мл культуральной среды. 10 мкл суспензии использовали для подсчета концентрации клеток в счетчике LUNA-II™ (Logos Biosystems, Корея).

Ежедневное прижизненное наблюдение за мини-трансплантатами и культурами клеток осуществляли с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Olympus IX81 (Olympus, Япония). Подготовку изображений осуществляли во внутренней программной среде микроскопа (CellSence).

Статистический анализ

Для статистического анализа полученных результатов были использованы категориальные данные, в которые были включены три числовых значения (0 –

нет адгезии и роста, 1 – мини-трансплантат фиксирован, 2 – мини-трансплантат фиксирован и есть выход клеток). Статистический анализ включал три теста.

Первый тест – определение влияния используемых сред (DMEM/F12 и EpiLife) на адгезию мини-трансплантата и выход из него клеток методом «таблицы 2×2» с расчетом точного теста Фишера с двусторонней проверкой гипотезы.

Второй тест – определение границ доверительного интервала, который позволяет рассчитать распределение данных признака по выборке и с вероятностью 90% определить истинное значение задаваемых параметров во всей выборке. Для определения границ доверительного интервала был использован модифицированный метод Вальда.

Третий тест – расчет вероятности положительного события (положительным событием мы считаем прикрепление кусочка, а также прикрепление и активный выход клеток из него). Был использован биномиальный тест, а именно тест знаков, который позволяет предположить, что событие и его отсутствие равновероятно имеют вероятность 50%.

Иммунофенотипирование культуры клеток из роговичных лимбальных мини-трансплантатов

Для определения иммунофенотипа суспензию культуры третьего пассажа клеток, культивированных на среде DMEM/F12, разделяли по пробиркам на пять равных частей (по 260 тыс. клеток на пробирку) и отмывали от полной культуральной среды в 2 мл буфера (CellWASH, BD, США) дважды по 5 минут. Полученный осадок клеток окрашивали с использованием набора маркеров к мембранным белкам CD105, CD90, CD166, CD29, CD34 (Biolegend, США), конъюгированных с флюорохромами согласно протоколу производителя. Для этого каждую пробирку инкубировали при 25 °C в темноте в течение 15 мин с антителами (из расчета 10 мкл раствора антител на 1 млн клеток). После инкубации осадок ресуспендировали в 1,0 мл буфера и осаждали при 200 g в течение 5 минут. Далее осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера и проводили анализ на проточном цитофлуориметре CytoFLEX® (Beckman Coulter, США). Построение кривых иммуноэкспрессии осуществлялось с помощью внутреннего программного обеспечения прибора.

Изучение адаптационных и адгезивных свойств культуры клеток из роговичных лимбальных мини-трансплантатов

Для эксперимента был использован донорский человеческий роговичный материал, не пригодный для трансплантации в виде четырех роговично-склеральных дисков.

Подготовку роговиц (холодовая клеточная элиминация) проводили после выполнения всех этапов алгоритма подготовки донорского трупного роговичного материала по ранее описанной методике [19]. Роговицы подготавливали таким образом, что весь эпителий был полностью удален до Боуеновой мембраны, а лимб защищен от оставшейся конъюнктивной ткани. Затем полученные роговичные диски по отдельности помещали в новые стерильные прозрачные флаконы с раствором для хранения роговицы (ПУ ФСР № 2010106650, ООО «НЭП МГ», РФ) и их оставляли при +4 °C на период 45–62 дня. Состояние роговичных дисков контролировали по цвету раствора (красно-оранжевый и прозрачный, если не контаминирован). Перед посевом клеток роговично-склеральные диски дважды промывали в PBS (англ. phosphate buffered saline – буферный фосфатно-солевой раствор) в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего из каждого образца трепаном диаметром 6,0 мм (Barron, Katena Products, Inc., США) выкраивали центральный участок роговицы и помещали его в лунку 96-луночного планшета (32496, SPL Lifesciences, Южная Корея) Боуеновой мембраной наружу, а Десцеметовой – к поверхности дна лунки.

Для оценки способности культивированных ЛСК к адгезии к Боуеновой мембране донорской роговицы выполняли посевы ЛСК третьего пассажа на подготовленные роговичные диски, расположенные в лунках планшета. Были использованы суспензии клеток, полученных из мини-трансплантатов, выкроенных механически (контроль), и с использованием ФСЛ (опыт) на разных уровнях энергии. Посев суспензии ЛСК выполняли на переднюю поверхность роговичных дисков из расчета 140 тыс. клеток на диск (1238,49 клетки на 1 мм²). Культивирование проводили в стандартных условиях в течение 14 дней с использованием среды EpiLife (0,06 мМ Ca⁺⁺) и добавок для ЛЭСК, как описано выше. Смену культуральной среды проводили каждые 2–3 дня. Прижизненное наблюдение осуществляли с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Olympus IX81. Получение изображений осуществлялось во внутренней программной среде микроскопа (CellSence).

Гистологическое исследование роговиц

Спустя 14 дней культивирования роговичные диски подготавливали для последующего гистологического анализа. Их извлекали из лунок и трижды промывали в PBS в течение 10 мин. Затем каждый из них фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина (141328, AppliChem, Германия) в течение 24 часов и разрезали пополам для выполнения поперечных срезов. Далее половины роговичных дисков промывали проточной водой и обезвоживали в

спиртах восходящей концентрации. Затем заливали в парафин и выполняли серию гистологических срезов толщиной 10 мкм, окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике. Препараты изучали и фотографировали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Olympus IX81 в режиме проходящего света при увеличениях ×40, ×100.

Полученные фотографии анализировали в программе Fiji (ImageJ 2.0.0-rc69/1.52) [20]. Статистическую обработку выполняли на персональном компьютере с использованием статистических программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение первичной культуры ЛСК *in vitro*

Спустя 3 дня культивирования отмечали, что первичное прикрепление мини-трансплантатов было достигнуто не во всех лунках. Известно, что для полноценного роста ЛСК необходима плотная адгезия к поверхности культуральной лунки, а отсутствие фиксации мини-трансплантатов приводит к образованию дебриса, отмиранию дифференцированных клеток, а также в ряде случаев к отсутствию образования монослоя первичной культуры клеток. Поэтому с целью предотвращения данного явления однократно использовали когезивный вискоэластик ProVisc (Alcon, США), содержащий в своем составе 1,0% гиалуроната натрия и имеющий нейтральный pH, согласно рекомендациям в ряде ранее опубликованных работ [21, 22]. Для этого из лунки полностью удаляли культуральную среду и наносили 2 капли вискоэластика на мини-трансплантат. Затем по капле добавляли 500 мкл полной культуральной среды и переносили в инкубатор. При первых и последующих осмотрах крайне аккуратно перемещали слайд-планшеты до инкубатора, стараясь придерживать дверь инкубатора при закрытии и открытии для предотвращения сотрясения мини-трансплантатов.

Первый контрольный осмотр после начала культивирования производили на 7-й день, далее контрольные осмотры выполняли каждые 3 дня.

При осмотре на 7-й день культивирования 31,25% мини-трансплантатов (n = 40) из общего числа лунок не были фиксированы к поверхности и свободно плавали в культуральной среде. На момент завершения культивирования на 14-й день роста из нефиксированных мини-трансплантатов не наблюдали, было замечено большое количество дебриса и мертвых недифференцированных клеток, свободно плавающих в культуральной среде.

Первичная культура клеток была получена во всех образцах, адгезированных к культуральной поверхности (68,75% мини-трансплантатов, n = 88). Морфологически клетки первичной культуры соответствовали типичной картине «булыжной мостовой»

во всех лунках в обеих группах. А именно клетки образовывали монослой от мини-трансплантата, имели крупное ядро и плотно прилегали друг к другу. В то же время была отмечена некоторая вариативность в размерах и форме клеток, больше соответствующая морфологии ММСК, более выраженная для образцов, культивированных в среде DMEM/F12. В течение всего срока культивирования в первичной культуре сохранялась морфология, характерная для эпителиальных клеток, и относительная равномерность их размеров.

В мини-трансплантатах, фиксированных к поверхности лунок и культивированных в DMEM/F12, первые участки роста клеток наблюдали на 5-й день от начала культивирования. От края мини-трансплантата образовывались небольшие скопления клеток, морфологически схожих с ЛЭСК, имеющие округлую форму и крупное ядро. В части образцов уже к 7-м суткам наблюдали вытянутые по форме клетки с мелким ядром (ММСК). По мере роста они распространялись по поверхности лунки дальше от мини-трансплантата, образуя полости. Чем ближе образуемые полости были к мини-трансплантату, тем больше они заполнялись ЛЭСК. Отмечено, что в образцах, где встречались ММСК, количество ЛЭСК было намного больше (рис. 3).

При культивировании на полной культуральной среде на базе EpiLife первые признаки роста отмечали также на 5-й день. На 7-й день наблюдения в

первичной культуре наблюдали как ММСК, так и ЛЭСК (рис. 4).

В целом рост клеток на среде EpiLife от первичного пассажа и до завершения культивирования на 14-й день был медленнее по сравнению с мини-трансплантатами, культивированными в среде DMEM/F12. Однако на завершающем сроке наблюдения на 14-й день количество лунок с адгезированными мини-трансплантатами и ростом клеток составило в среде EpiLife 38,6%, в то время как в среде DMEM/F12 – 31,8% (табл. 1). Культура клеток на среде EpiLife имела характерные отличия: в основном присутствовали мелкие полигональные клетки с крупным ядром, встречались небольшие участки с более крупными клетками и относительно меньшим ядром, что характерно для созревающих клеток.

Пролиферация ЛСК в зависимости от способа выделения мини-трансплантатов

Спустя 7 дней от начала культивирования отмечали большее количество пролиферирующих клеток из мини-трансплантатов, полученных традиционным методом при помощи микрохирургических инструментов по сравнению с ростом клеток, зафиксированных в лунках с мини-трансплантатами, полученными путем выкраивания ФСЛ – 45,4 и 31,8% соответственно. Однако при последующем осмотре на 11-й день произошло опережение по показателям роста в образцах, полученных при помощи ФСЛ. К последнему сроку наблюдения на 14-й день количество лунок с зафиксированным ростом клеток из мини-трансплантатов, полученных ФСЛ, было заметно большим и составило 77,2% в отличие от контрольной группы – 63,6% (табл. 2).

Пролиферация ЛСК в зависимости от уровня энергии ФСЛ

При анализе пролиферации клеток из мини-трансплантатов, полученных путем диссекции на разных уровнях энергии, были выявлены различия в скорости роста и количестве лунок с ростом клеток. Наилучшие показатели пролиферации на сроке наблюдения 7 дней продемонстрировали образцы мини-трансплантатов, полученные с использованием 110% уровня энергии ФСЛ (42,8%), а наименьшие показатели роста были зафиксированы на уровне энергии ФСЛ, равной 120% (25%). На 11-й день наблюдения картина роста кардинально поменялась, и наилучшие показатели роста уже были продемонстрированы в образцах, полученных со 120% уровнем затраченной энергии ФСЛ (75%), наименьшие – в образцах со 100% уровнем энергии ФСЛ (42,8%). К последнему сроку наблюдения на 14-й день данные роста клеток в лунках с мини-трансплантатами,

Таблица 1

Процентное количество лунок с фиксированным ростом ЛСК в зависимости от культуральной среды

Percentage number of wells with fixed growth of LSCs depending on culture medium

Сроки наблюдения	DMEM	EPL
7-й день	20,4	18,1
11-й день	22,7	20,4
14-й день	31,8	38,6

Таблица 2

Процентное количество лунок с фиксированным ростом ЛСК в зависимости от метода получения мини-трансплантатов

Percentage number of wells with fixed growth of LSCs depending on the method of obtaining mini-grafts

Сроки наблюдения	ФСЛ	Механический способ
7-й день	31,8	45,4
11-й день	59,0	54,7
14-й день	77,2	63,6

полученными путем выкраивания ФСЛ на уровнях энергии в 100, 110 и 120%, составили 71,4; 71,4; 87,5% соответственно (табл. 3).

Статистический анализ

При определении влияния используемых сред (DMEM/F12 и EpiLife) на адгезию мини-трансплан-

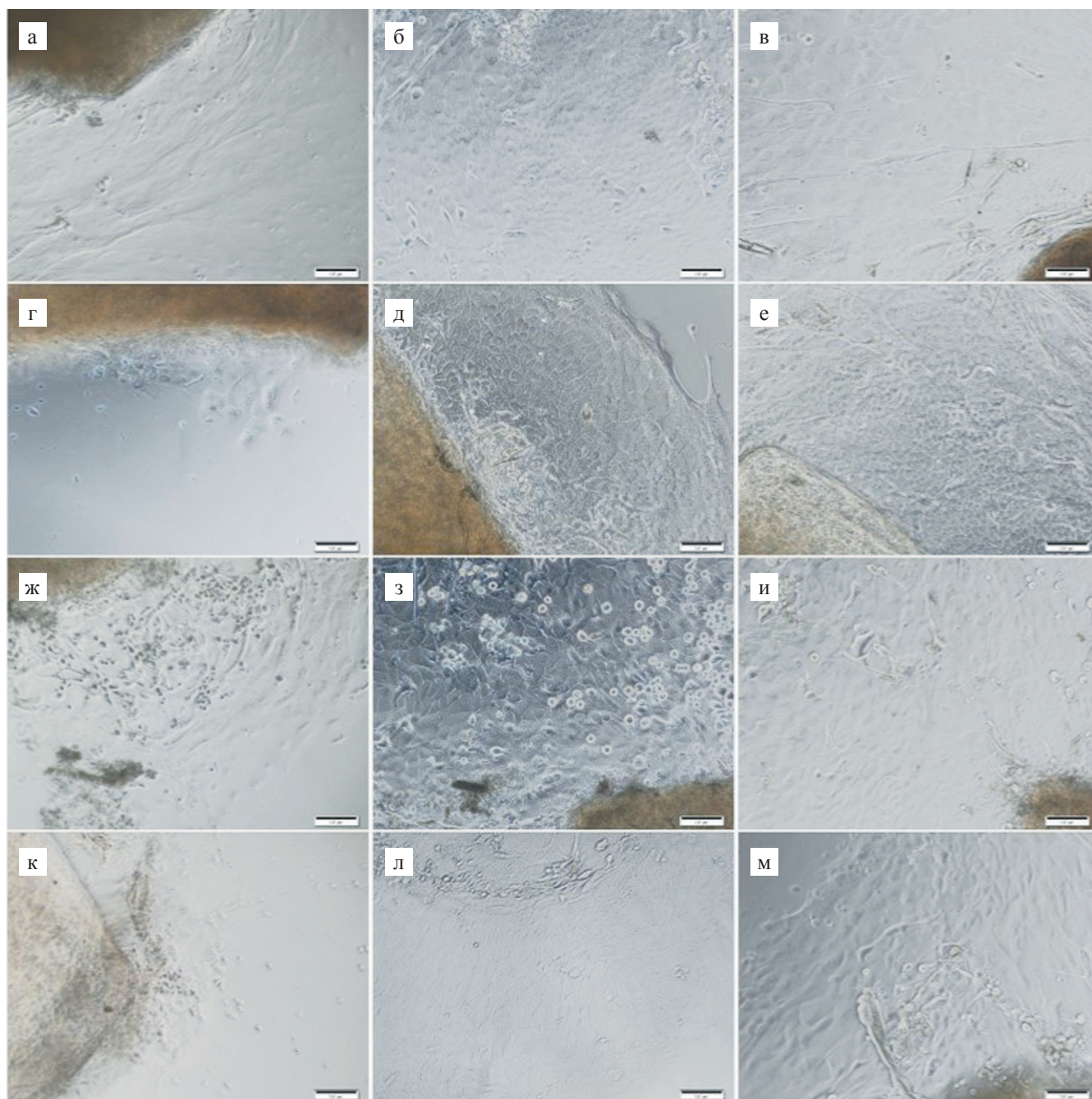


Рис. 3. Культура клеток, полученная из всех видов мини-трансплантатов на среде DMEM/F12. Разные сроки наблюдения (по горизонтали слева направо – 7, 11, 14-й день культивирования соответственно): а–в – культура клеток из мини-трансплантата, полученного с использованием 100% уровня энергии фемтосекундного лазера; г–е – культура клеток из мини-трансплантата, полученного с использованием 110% уровня энергии фемтосекундного лазера; ж–и – культура клеток из мини-трансплантата, полученного с использованием 120% уровня энергии фемтосекундного лазера; к–м – культура клеток из мини-трансплантата, полученного с использованием микрохирургических инструментов. Световая фазово-контрастная микроскопия. $\times 100$

Fig. 3. Cell culture obtained from all types of mini-grafts on a DMEM/F12 medium. Different observation times (horizontally from left to right – days 7, 11 and 14 of culturing, respectively): а–в – cell culture from mini graft obtained using 100% FSL energy level; г–е – cell culture from a mini graft obtained using 110% FSL energy level; ж–и – cell culture from a mini-graft obtained using 120% FSL energy level; к–м – cell culture from a mini graft obtained using microsurgical instruments. Light phase-contrast microscopy. Magnification $\times 100$

тата и выход из него клеток методом «таблицы 2×2 » с расчетом точного теста Фишера с двусторонней проверкой гипотезы показано, что данные составы

сред статистически достоверно не влияют на прикреплению и выход клеток в группах «нож» и «лазер» ($p > 0,05$), однако было показано наличие статисти-

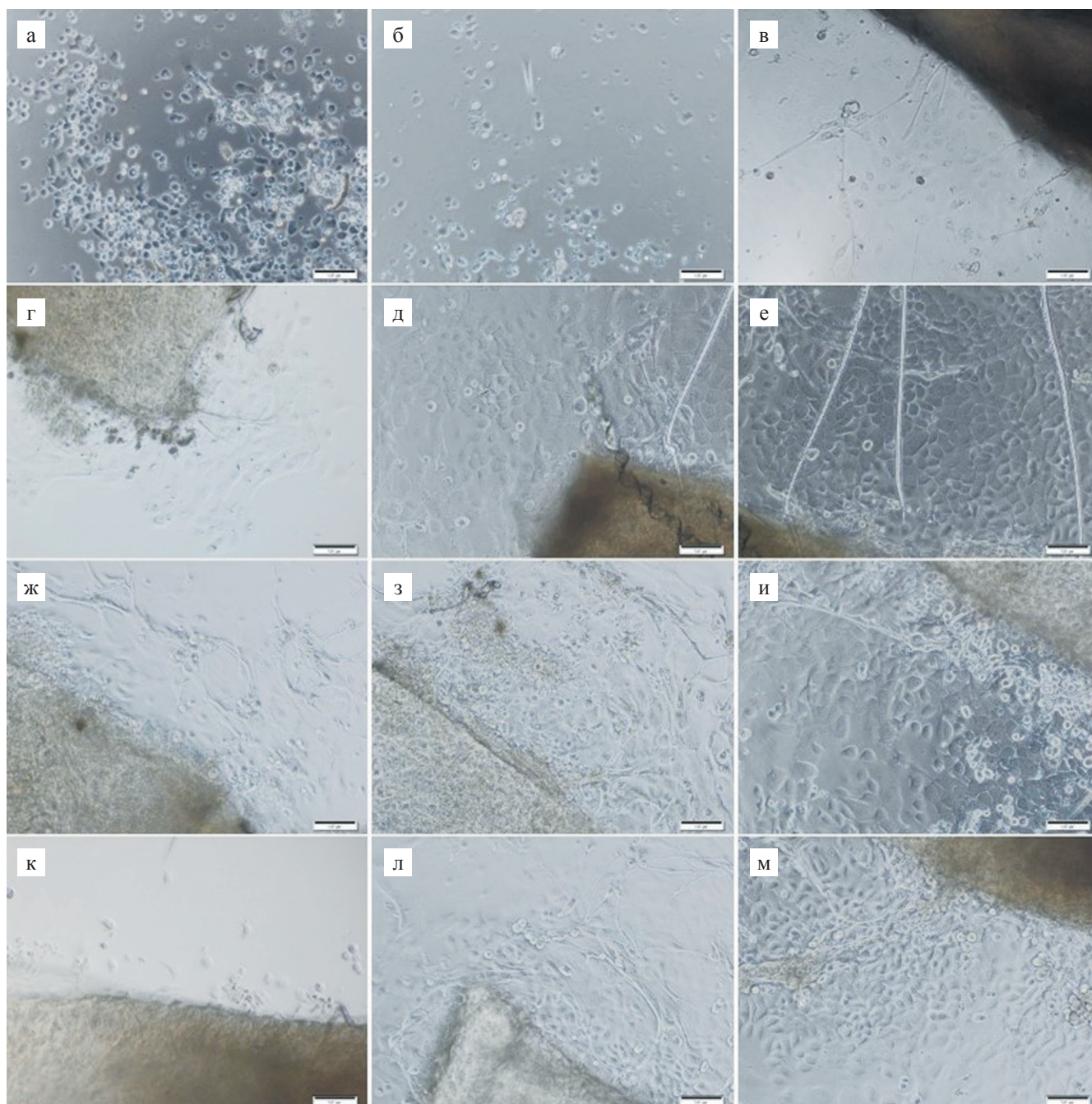


Рис. 4. Культура клеток, полученная из всех видов мини-трансплантатов на среде EpiLife. Разные сроки наблюдения (по горизонтали слева направо – 7, 11, 14-й день культивирования соответственно): а–в – культура клеток из мини-трансплантата, полученного с использованием 100% уровня энергии фемтосекундного лазера; г–е – культура клеток из мини-трансплантата, полученного с использованием 110% уровня энергии фемтосекундного лазера; ж–и – культура клеток из мини-трансплантата, полученного с использованием 120% уровня энергии фемтосекундного лазера; к–м – культура клеток из мини-трансплантата, полученного с использованием микрохирургических инструментов. Световая фазово-контрастная микроскопия. $\times 100$

Fig. 4. Cell culture obtained from all types of mini-grafts on an EpiLife medium. Different observation times (horizontally from left to right – days 7, 11 and 14 of culturing, respectively): а–в – cell culture from mini graft obtained using 100% FSL energy level; г–е – cell culture from a mini graft obtained using 110% FSL energy level; ж–и – cell culture from a mini-graft obtained using 120% FSL energy level; к–м – cell culture from a mini graft obtained using microsurgical instruments. Light phase-contrast microscopy. Magnification $\times 100$

Таблица 3

Процентное количество лунок с фиксированным ростом ЛСК в зависимости от уровня энергии ФСЛ, затраченного для выкраивания мини-трансплантатов

Percentage number of wells with fixed growth of LSCs depending on the FSL energy level expended to excise mini-grafts

Сроки наблюдения	100% энергии	110% энергии	120% энергии
7-й день	28,5	42,8	25,0
11-й день	42,8	57,1	75,0
14-й день	71,4	71,4	87,5

чески значимой ассоциации признаков между способами получения мини-трансплантатов «лазер» и «нож», где в группе «лазер» были показаны лучшие результаты ($p < 0,05$).

При определении границ доверительного интервала с использованием модифицированного метода Вальда показано, что на 7-е сутки границы доверительного интервала в группе «лазер 100%» [35%; 78%], «лазер 110%» [57%; 98%], «лазер 120%» [42%; 84%], «нож» [54%; 80%] (рис. 5); а на 14-е сутки границы в группе «лазер 100%» [50%; 65%], «лазер 110%» [80%; 92%], «лазер 120%» [59%; 73%], «нож» [64%; 72%] (рис. 6).

При подсчете границ доверительного интервала ожидаемые положительные результаты на 7-е сутки с вероятностью 90% получены в группе «лазер 110%» и «нож». На 14-е сутки во всех группах получены положительные результаты. Однако на 14-е сутки максимально значимые результаты были получены в группе «лазер 110%» (график 2).

При расчете вероятности положительного события (положительным событием мы считаем прикрепление кусочка, а также прикрепление и активный выход клеток из него) с использованием биномиального теста выявлено, что в группе «лазер» при одностороннем тесте знаков вероятность наблюдения положительного или успешного результата составляет 81,25% ($p = 0,003$). Соответственно, в группе «нож» вероятность наблюдения положительного или успешного результата составляет 56,25% ($p = 0,029$).

Анализ данных проточной цитофлуориметрии

Для выполнения иммунофенотипирования полученной культуры клеток наряду с анализом морфологической картины была проведена проточная цитофлуориметрия. Исследовали культуры клеток, полученные на 21-е сутки культивирования мини-трансплантатов, выкроенных механическим путем и с использованием ФСЛ на уровне энергии в 120%. Нами были изучены уровни экспрессии следующих

маркеров, характеризующих как ММСК, так и ЛЭСК: CD105 (эндоглин) – рецептор TGF- β III, имеющийся у эндотелиальных клеток, синцитио-трофобластов, макрофагов и фибробластов соединительной ткани, у ММСК эндоглин играет преимущественно сигнальную роль в процессах хондрогенной дифференцировки и участвует во взаимодействии ММСК и гемопоэтических клеток в костном мозге; CD90 (Thy-1, дифференцировочный антиген Т-лимфоцитов) широко используется для фенотипирования ММСК, экспрессируется пролиферирующими клетками; CD166 и CD29 – маркеры клеток, начинающих свой путь дифференцировки и пока не имеющих принадлежности к конкретному виду клеток; CD34 – отрицательный маркер ММСК. В результате по данным проточной цитофлуориметрии получена гетерогенная культура клеток, содержащая в своем составе незначительное количество ММСК и преобладающее количество ЛЭСК. Морфологическая картина двух образцов позволила сделать вывод о получении в обоих случаях фенотипически идентичных культур клеток (табл. 4).

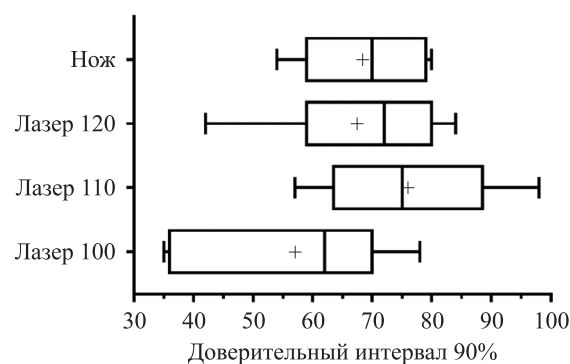


Рис. 5. Границы доверительного интервала на 7-е сутки наблюдения в исследуемых группах

Fig. 5. Confidence limits on day 7 of observation in the test groups

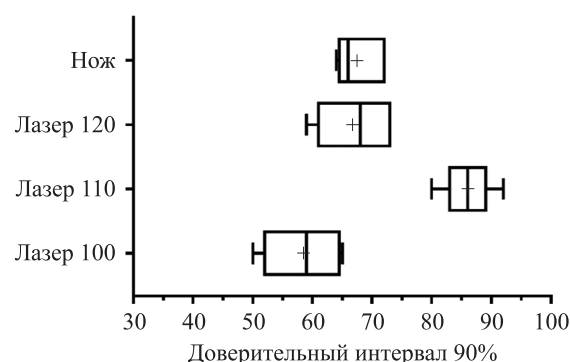


Рис. 6. Границы доверительного интервала на 14-е сутки наблюдения в исследуемых группах

Fig. 6. Confidence limits on day 14 of observation in the test groups

Культивирование ЛСК 3-го пассажа на бесклеточной донорской роговице

Осмотр культуры клеток на поверхности роговиц с помощью фазово-контрастного микроскопа был крайне затруднен, поскольку ткань стромы роговицы в условиях постоянного нахождения в культуральной среде теряла прозрачность. Спустя две недели наблюдения проводили гистологическое исследование срезов исследуемых роговиц. В результате на всех образцах донорской роговицы зарегистрировали формирование монослоя клеток, фиксированных к Боуеновой мембране. В основном клетки имели малый размер с крупным полигональным ядром, среди которых встречались клетки веретеновидной формы с мелким ядром. В периферических участках

роговицы, при формировании впадин, наблюдали группы клеток, образующих конгломераты (рис. 7).

Таблица 4

Иммуно-фенотипический анализ экспрессии поверхностных маркеров в культуре ЛСК 3-го пассажа, %

Immunophenotypic analysis of surface marker expression in a culture of passage 3 LSCs, %

Анализируемые маркеры	Уровень экспрессии	
	ФС лазер 120%	Нож
CD105	0,49	0,42
CD90	26,84	28,26
CD166	99,89	99,95
CD29	99,95	99,96
CD34	0,11	0,15

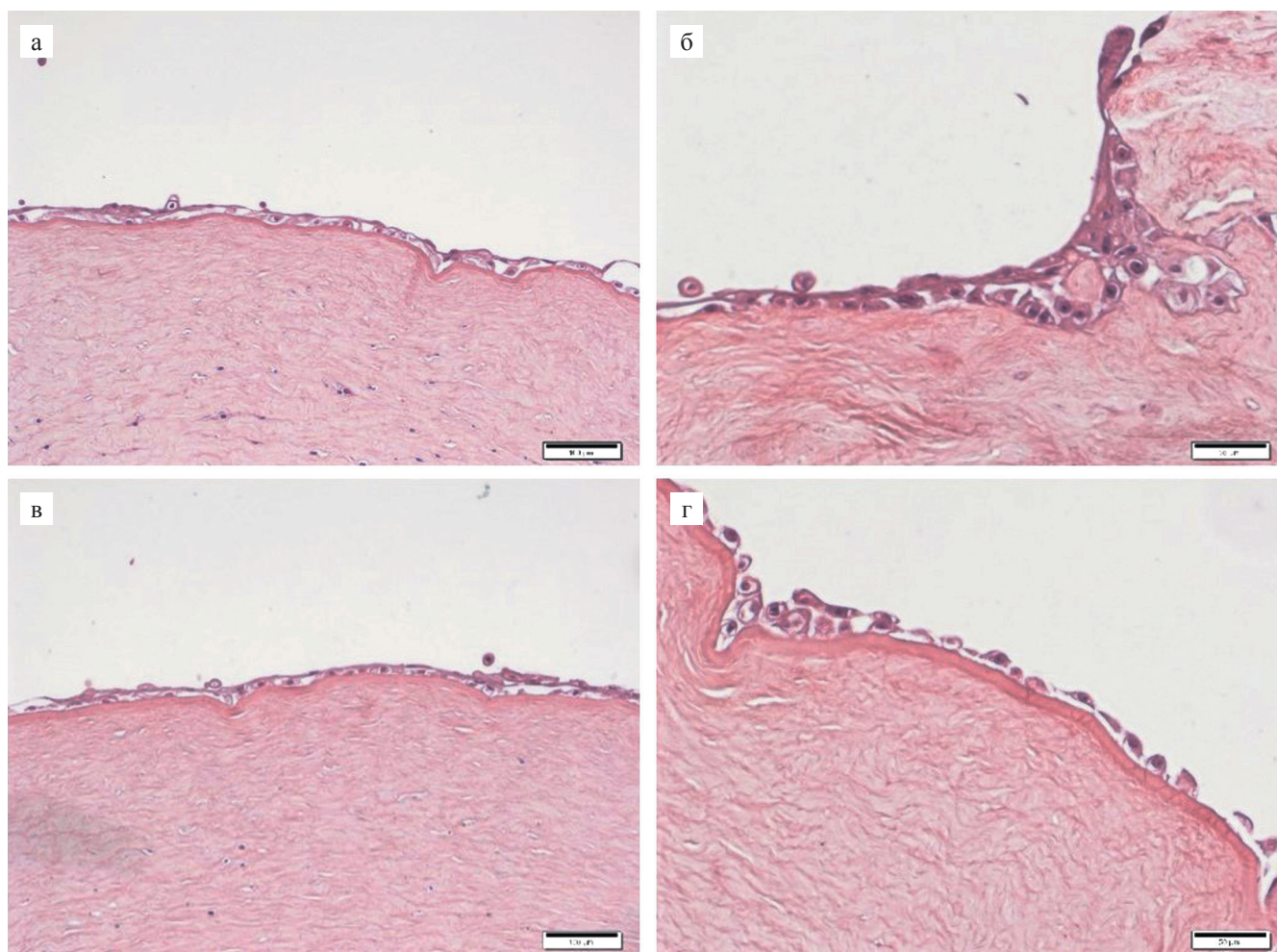


Рис. 7. Гистологическая картина донорских инвертированных роговиц с монослоем клеток, полученных от разных культур клеток 3-го пассажа: а – культура, полученная из мини-трансплантата, выкроенного механическим путем, в – культура, полученная из мини-трансплантата, выкроенного ФСЛ на энергии 100%, $\times 100$; б – культура, полученная из мини-трансплантата, выкроенного ФСЛ на энергии 110%, г – культура, полученная из мини-трансплантата, выкроенного ФСЛ на энергии 120%, $\times 50$. Окрашивание гематоксилин-эозином

Fig. 7. Histological picture of donor inverted corneas with cell monolayer obtained from different cell cultures of the third passage: а – culture obtained from a mechanically excised mini-graft, в – culture obtained from a mini-graft excised by FSL at 100% energy, magnification $\times 100$; б – culture obtained from a mini-graft excised by FSL at 110% energy, г – culture obtained from a mini-graft excised by FSL at 120% energy, magnification $\times 50$. H&E stain

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время происходит процесс активного поиска эффективного способа реконструкции эпителиального слоя роговицы у пациентов с односторонним СЛН. Разработка хирургической методики, применяемой при данном заболевании, должна учитывать анатомические и функциональные особенности лимбальной зоны.

Основной компонент лимба – палисады Вогта. Эти углубления имеют уникальную генную экспрессию и внеклеточный протеиновый профиль (внеклеточный матрикс), которые специфичны и критически значимы в функционировании ЛЭСК. В базальном эпителиальном слое лимбальных ниш ЛЭСК делятся на идентичные клетки в горизонтальной плоскости или асимметрично, продуцируя тем самым идентичные ЛЭСК, а в горизонтальной и вертикальной плоскостях – на транзиторные амплифицирующие клетки (ТАК). Затем ТАК делятся на постмитотические клетки, которые мигрируют центростремительно. Затем постмитотические клетки дифференцируются в терминально-дифференцированные клетки (ТДК) и слущиваются с поверхности роговицы. Помимо клеток-предшественников лимбального эпителия в лимбальной нише располагаются мезенхимальные мультипотентные стволовые клетки (ММСК), меланоциты, иммунные клетки, сосудистые и нервные клетки, внеклеточный матрикс и сигнальные молекулы (факторы роста и цитокины) [3–8].

Особую роль в регулировании ЛЭСК играют ММСК. Маркеры ММСК CD90 и CD105 располагаются под базальной мембраной лимбальной крипты и тесно взаимодействуют с ЛЭСК [23–25]. ММСК соприкасаются с ЛЭСК через ряд молекулярных субстратов и сигнальных путей, которые включают аквапорин-1 и виментин [26], хондроитин сульфат [24], SDF-1/CXCR4 [27], BMP/Wnt [28] и IL-6/STAT3 [29]. Дополнительные механизмы взаимодействия осуществляются через межклеточные контакты, секрецию факторов роста и экспрессию цитокинов [30].

Данные о строении лимбальной ниши и ее микроокружения, необходимом для ее полноценного функционирования, говорят о принципиально важном сохранении всех компонентов лимбальной ниши при операциях, направленных на восстановление эпителиального слоя роговицы.

Наличие в настоящее время в офтальмологической практике ФСЛ, способных работать на самых низких уровнях энергии, минимизируя при своей работе травматизацию и гибель ЛЭСК, делает подход к использованию ФСЛ в реконструкции роговичного эпителия более привлекательным.

Следует отметить, что впервые результаты применения фемтосекундных лазеров в кератолимбальной аллотрансплантации (KLAL) описаны корейскими

учеными в 2010 году. Ими проводилось формирование кератолимбального трансплантата по типу кольца для дальнейшей пересадки реципиенту. В данной технологии был использован фемтосекундный лазер (IntraLase, США), с помощью которого производили формирование кератолимбального трансплантата путем его выкраивания на глазу донора так, что интактной оставалась лишь дистальная граница кератолимбального трансплантата со стороны склеры. Ее выкраивание выполняли вручную с использованием алмазного ножа по той причине, что используемое апланационное кольцо в комплекте данного лазера имело максимальный диаметр 9,5 мм [31]. Авторы отметили, что применение фемтосекундного лазера в технологии KLAL позволяет выкроить трансплантат предсказуемо тонким, значительно уменьшает риски и время, затраченное на формирование трансплантата.

На данный момент на территории Российской Федерации используются следующие лазерные системы: VisuMax (Carl Zeiss Meditec, Германия), IntraLase (Abbot medical optics, США), LensX и WaveLight (Alcon, США), Фемто Визум («Оптосистемы», Россия) и Femto LDV Z8 (Ziemer, Швейцария). Последние два варианта лазеров отличаются тем, что работают на минимально возможном уровне энергии, находящемся в диапазоне наноджоулей (nJ), что позволяет производить диссекцию ткани с меньшей ответной реакцией на воздействие лазера и меньшим количеством апоптических клеток [32]. Этот эффект достигается благодаря работе лазера на самых низких из возможных уровней энергии, но с более высокой частотой реза. Отличительной особенностью лазера Femto LDV Z8 (Ziemer, Швейцария) является наличие мобильной рукоятки, которая может быть позиционирована на глазу под любым необходимым углом, также данный лазер оборудован встроенной системой оптической когерентной томографии, что позволяет сделать работу лазера предсказуемой, контролируемой и безопасной.

В данной работе нами оценены безопасность и эффективность применения низкоэнергетического высокочастотного ФСЛ Femto LDV Z8 (Ziemer, Швейцария) по отношению к ЛЭСК. В клинике его использование в рамках технологии GSLET позволит значительно сократить время операции, минимизировать риски получения неравномерного и неполноценного по своему составу лимбального трансплантата.

В среде EpiLife наблюдали преимущественный выход полигональных эпителиально-подобных клеток, в то время как в среде DMEM/F12 также наблюдали выход ММСК-подобных клеток. При этом известно, что ММСК необходимы для полноценного созревания ЛЭСК.

В процессе культивирования нам удалось выяснить, что выход клеток из мини-трансплантатов,

выкроенных при помощи ФСЛ, больше (77,2%), чем в группе с мануальным выделением мини-трансплантатов (63,6%). Данный факт свидетельствует о том, что использование ФСЛ позволяет выполнить точное выкраивание лимбальных мини-трансплантатов на программируемой глубине с захватом лимбальной ниши целиком со всем ее окружением.

При сравнении культур клеток, полученных путем выкраивания мини-трансплантатов ФСЛ на разных уровнях энергии, наибольший выход клеток наблюдали в группе с использованием 120% уровня энергии лазера, однако в момент первого контрольного осмотра показатели этой группы были ниже остальных. Вероятно, это может быть связано с большим повреждающим действием энергии на периферические границы мини-трансплантата и торможения выхода новых клеток, преодолевающих вал мертвых клеток на краях мини-трансплантата. Большее количество клеток (87,5%) в полученной культуре на последнем сроке наблюдения может свидетельствовать о полноценном выкраивании лазером всех необходимых элементов лимбальной ниши, функционирующих в комплексе, без дополнительных манипуляций в момент эвакуации мини-трансплантата из лимбального ложа, что наблюдалось в группах «лазер 100%» и «лазер 110%». Следует также учитывать, что согласно статистическому анализу, вероятность успешной адаптации мини-трансплантата была максимальной в группе «лазер 110%».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлен протокол культивирования лимбальных мини-трансплантатов, полученных с использованием ФСЛ, демонстрирующий активный рост ЛСК. Культуры клеток, полученные из мини-трансплантатов, выкроенных ФСЛ, способны к росту на протяжении длительного времени, как минимум в течение 21 суток, что говорит о безопасности применения ФСЛ в технологии GSLET.

Применение ФСЛ позволяет прецизионно выкраивать лимбальные мини-трансплантаты на контролируемой глубине с его одновременной фрагментацией, что представляется нам и более безопасным и эффективным по сравнению с традиционной механической «ножевой» методикой выкраивания. Данный метод имеет реальные перспективы дальнейшего внедрения в клиническую практику.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983; 24: 1442–1443.
2. Del Monte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg.* 2011; 37: 588–598.
3. Parfitt GJ, Kavianpour B, Wu KL, Xie Y, Brown DJ, Jester JV. Immunofluorescence tomography of mouse ocular surface epithelial stem cells and their niche microenvironment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56: 7338–7344.
4. Grieve K, Ghoubay D, Georgeon C, Thouvenin O, Bouheraoua N, Paques M et al. Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche. *Exp Eye Res.* 2015; 140: 75–84.
5. Ramirez BE, Victoria DA, Murillo GM, Herreras JM, Calonge M. In vivo confocal microscopy assessment of the corneoscleral limbal stem cell niche before and after biopsy for cultivated limbal epithelial transplantation to restore corneal epithelium. *Histol Histopathol.* 2015; 30: 183–192.
6. Massie I, Dziasko M, Kureshi A, Levis HJ, Morgan L, Neale M et al. Advanced imaging and tissue engineering of the human limbal epithelial stem cell niche. *Methods Mol Biol.* 2015; 1235: 179–202.
7. Nubile M, Curcio C, Dua HS, Calienno R, Lanzini M, Iezzi M et al. Pathological changes of the anatomical structure and markers of the limbal stem cell niche due to inflammation. *Mol Vis.* 2013; 19: 516–525.
8. Notara M, Shortt AJ, O'Callaghan AR, Daniels JT. The impact of age on the physical and cellular properties of the human limbal stem cell niche. *Age.* 2013; 35: 289–300.
9. Notara M, Refaian N, Braun G, Steven P, Bock F, Cursiefen C. Short-term uvb irradiation leads to putative limbal stem cell damage and niche cell-mediated upregulation of macrophage recruiting cytokines. *Stem Cell Res.* 2015; 15: 643–654.
10. Kim BY, Riaz KM, Bakhtiari P, Chan CC, Welder JD, Holland EJ et al. Medically reversible limbal stem cell disease: clinical features and management strategies. *Ophthalmology.* 2014; 121: 2053–2058.
11. Deng SX, Borderie V, Chan CC, Dana R, Figueiredo FC, Gomes JAP et al. Global Consensus on Definition, Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea.* 2019; 38 (3): 364–375.
12. Малиюгин БЭ, Герасимов МЮ, Борзенков СА, Головин АВ. Клеточная хирургия при дисфункции стволовых клеток лимба. *Офтальмохирургия.* 2019; (1): 77–86. Malyugin BE, Gerasimov MYu, Borzenok SA, Golovin AV. Simple limbal epithelial transplantation (a literature review). *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery.* 2019; (1): 77–86. [In Russ, English abstract]. <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2019-1-77-86>.
13. Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, Balasubramanian D. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol.* 2012; 96: 931–934.
14. Basu S, Sureka SP, Shanbhag SS, Kethiri AR, Singh V, Sangwan VS. Simple limbal epithelial transplantation: long-term clinical outcomes in 125 cases of unilateral chronic ocular surface burns. *Ophthalmology.* 2016; 123: 1000–1010.

15. Malyugin BE, Gerasimov MY, Borzenok SA. Glueless simple limbal epithelial transplantation. The report of the first two cases. *Cornea*. 2020; 39 (12): 1588–1591. doi: 10.1097/ICO.0000000000002467.
16. Борзенко СА, Герасимов МЮ, Комах ЮА, Хубецова МХ, Тонаева ХД, Маликова ЛМ, Плакса ПИ. Алгоритм инфекционного скрининга доноров роговиц в Глазном тканевом банке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова». *Офтальмохирургия*. 2022; 2: 54–59. Borzenok SA, Gerasimov MYu, Komakh YuA, Khubetsova MKh, Tonaeva HD, Malikova LM, Plaksa PI. An algorithm for infectious screening of corneal donors in eye tissue bank of the S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2022; 2: 54–59. [In Russ, English abstract]. <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2022-2-54-59>.
17. Малугин БЭ, Борзенко СА, Герасимов МЮ. Клинические результаты трансплантации аутологичного культивированного эпителия полости рта при дисфункции стволовых клеток лимба роговицы. *Офтальмохирургия*. 2020; (4): 77–85. Malyugin BE, Borzenok SA, Gerasimov MYu. Clinical outcomes of autologous cultured oral mucosal epithelium transplantation for treatment of limbal stem cell deficiency. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2020; 4: 77–85. [In Russ, English abstract]. <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2020-4-77-85>.
18. Борзенко СА, Малугин БЭ, Герасимов МЮ, Островский ДС. Методические основы трансплантации аутологичного культивированного эпителия полости рта. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2021; 23 (1): 171–177. Borzenok SA, Malyugin BE, Gerasimov MYu, Ostrovsky DS. Cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2021; 23 (1): 171–177. [In Russ, English abstract] <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-1-171-177>.
19. Gerasimov MY, Ostrovskiy DS, Shatskikh AV, Borzenok SA, Malyugin BE. Labial mucosal epithelium grafting in an ex vivo human donor cornea model. *Exp Eye Res*. 2022; 216: 108931. doi: 10.1016/j.exer.2022.108931.
20. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9 (7): 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
21. Andjelic S, Lumi X, Vereb Z, Josifovska N, Facsko A, Hawlina M et al. A simple method for establishing adherent ex vivo explant cultures from human eye pathologies for use in subsequent calcium imaging and inflammatory studies. *J Immunol Res*. 2014; 2014: 232659. doi: 10.1155/2014/232659.
22. Szabó DJ, Noer A, Nagymihály R, Josifovska N, Andjelic S, Veréb Z et al. Long-Term Cultures of Human Cornea Limbal Explants Form 3D Structures Ex Vivo – Implications for Tissue Engineering and Clinical Applications. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0143053. doi: 10.1371/journal.pone.0143053.
23. Yamada K, Young RD, Lewis PN, Shinomiya K, Meek KM, Kinoshita S et al. Mesenchymal-epithelial cell interactions and proteoglycan matrix composition in presumptive stem cell niche of the rabbit corneal limbus. *Mol Vis*. 2015; 21: 1328–1339.
24. Dziasko MA, Armer HE, Levis HJ, Shortt AJ, Tuft S, Daniels JT. Localisation of epithelial cells capable of holoclone formation *in vitro* and direct interaction with stromal cells in the native human limbal crypt. *PLoS One*. 2014; 9: e94283.
25. Mathews S, Chidambaram JD, Lanjewar S, Mascarenhas J, Pranja NV, Muthukkaruppan V et al. In vivo confocal microscope analysis of normal human anterior limbal stroma. *Cornea*. 2015; 34: 464–470.
26. Higa K, Kato N, Yoshida S, Ogawa Y, Shimazaki J, Tsubota K et al. Aquaporin 1-positive stromal niche-like cells directly interact with N-cadherin-positive clusters in the basal limbal epithelium. *Stem Cell Res*. 2013; 10: 147–155.
27. Xie HT, Chen SY, Li GG, Tseng SC. Limbal epithelial stem/progenitor cells attract stromal niche cells by SDF-1/CXCR4 signaling to prevent differentiation. *Stem Cell*. 2011; 29: 1874–1885.
28. Han B, Chen SY, Zhu YT, Tseng SC. Integration of BMP/Wnt signaling to control clonal growth of limbal epithelial progenitor cells by niche cells. *Stem Cell Res*. 2014; 12: 562–573.
29. Notara M, Shroff AJ, Galatowicz G, Calder V, Daniels JT. IL6 and the human limbal stem cell niche: a mediator of epithelial-stromal interaction. *Stem Cell Res*. 2010; 5: 188–200.
30. Polisetti N, Agarwal P, Khan I, Kondaiah P, Sangwan VS, Vemuganti GK. Gene expression profile of epithelial cells and mesenchymal cells derived from limbal explant culture. *Mol Vis*. 2010; 16: 1227–1240.
31. Choi S, Kim J, Lee D. A New Surgical Technique: A Femtosecond Laser-Assisted Keratolimbal Allograft Procedure. *Cornea*. 2010; 29: 924–929.
32. Riau AK, Liu YC, Lwin NC, Ang HP, Tan NY, Yam GH et al. Comparative study of nJ- and μ J-energy level femtosecond lasers: evaluation of flap adhesion strength, stromal bed quality, and tissue responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55: 3186–3194. doi: 10.1167/iov.14-14434.

Статья поступила в редакцию 07.05.2023 г.
The article was submitted to the journal on 07.05.2023