

# СОТРАНСПЛАНТАЦИЯ ММСК-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЛИМБА СПОСОБСТВУЕТ МЕСТНОЙ ИММУНОКОРРЕКЦИИ И ПРОЗРАЧНОМУ ПРИЖИВЛЕНИЮ ТРАНСПЛАНТАТА РОГОВИЦЫ ПРИ КЕРАТОПЛАСТИКЕ ВЫСОКОГО РИСКА

*Борзенко С.А.<sup>1,2</sup>, Онищенко Н.А.<sup>3</sup>, Тонаева Х.Д.<sup>1</sup>, Комах Ю.А.<sup>1</sup>, Ковшун Е.В.<sup>1</sup>, Струсова Н.А.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, кафедра глазных болезней, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

**Цель.** Оценить клинические результаты выживаемости трупной донорской роговицы у реципиентов группы высокого риска при сотрансплантации консервированных аллогенных лимбальных трансплантатов. **Материалы и методы исследования.** Пациентам с помутнением трансплантата роговицы и высоким риском отторжения ( $n = 69$ ) было выполнено 2 варианта сквозных кератопластик (СКП): при I варианте (основная группа,  $n = 36$ ) проводилась сотрансплантация донорской роговицы и аллогенных ММСК-подобных лимбальных клеток в виде лимбальных трансплантатов, при II варианте (контрольная группа,  $n = 33$ ) проводилась трансплантация только роговицы. **Результаты.** Наблюдение за пациентами в течение 1 года показало, что при I варианте СКП наблюдалось повышение доли прозрачного приживления трансплантата роговицы (86,1 вместо 69,7% в контроле) и сохранение в ней более высокой плотности эндотелиальных клеток (85,9 вместо 76,2% в контроле), при этом в слезной жидкости реципиентов отмечалось динамическое снижение уровня провоспалительных (IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) и повышение противовоспалительных (IL-10, IL-1RA, TGF $\beta$ ) цитокинов, а также более высокий уровень содержания HLA-G5 по сравнению с группой контроля. **Заключение.** Одномоментная пересадка предварительно консервированных лимбальных трансплантатов при кератопластике высокого риска создает условия, благоприятствующие прозрачному приживлению кератотрансплантата, по-видимому, за счет реализации иммунорегуляторной активности ММСК-подобных клеток лимба.

*Ключевые слова:* ММСК-подобные лимбальные клетки, кератопластика, трансплантаты роговицы, аллогенные лимбальные трансплантаты.

## MMSC-LIKE LIMBAL CELLS COTRANSPLANTATION PROMOTES LOCAL IMMUNOCORRECTION AND CORNEAL GRAFT TRANSPARENT RETENTION IN HIGH RISK KERATOPLASTY

*Borzenok S.A.<sup>1,2</sup>, Onishchenko N.A.<sup>3</sup>, Tonaeva Kh.D.<sup>1</sup>, Komakh Y.A.<sup>1</sup>, Kovshun Y.V.<sup>1</sup>, Strusova N.A.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> FSBI «The Academician S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex» of the Ministry of Public Health of Russia, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> SEI HPE «Moscow State Medical and Dental University. A.I. Evdokimov» of the Ministry of Health of Russia, Department of Ophthalmology, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> «V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs» of the Ministry of Public Health of Russia, Moscow, Russian Federation

**Aim** was to evaluate clinical results of donor corneal graft survival in high-risk recipients in co-transplantation of preserved allogenic limbal grafts. **Materials and methods.** Two types of penetrative keratoplasties were carried out in patients with corneal graft opacities and high risk of rejection (n = 69). Co-transplantation of donor cornea and allogenic MMSC-like limbal cells in the form of limbal transplants was carried out in the 1st group (n = 36); in the 2nd group (n = 33) only the cornea was transplanted. **Results.** Observation of the patients during one year after surgery showed that the rate of transparent cornea engraftment increased in the 1st group (86,1 against 69,7% in the 2nd group). The density of endothelial cells was also higher in the 1st group (85,9 against 76,2% in the 2nd group). At the same time, progressive decreasing of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) and increasing of anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-1RA, TGF $\beta$ ) along with higher level of HLA-G5 were revealed in the recipients' tear fluid in the 1st group in comparison to the 2nd group. **Conclusion.** Simultaneous transplantation of preserved limbal grafts with corneal graft in high-risk keratoplasty favors the transparent cornea engraftment, obviously, this is due to immunoregulatory activity of the MMSC-like limbal cells.

*Key words:* MMSC-like limbal cells, keratoplasty, corneal transplants, allogenic limbal grafts.

## ВВЕДЕНИЕ

По современным представлениям, непосредственным механизмом неблагоприятного исхода кератопластик (помутнение роговичного трансплантата) служит активация местного врожденного (неспецифического) и адаптивного (специфического) иммунитета, причем в роли индуктора деструктивного иммунного ответа и гибели трансплантата обычно выступают тканевые антигены донорской роговицы, клетки Лангерганса (дендритные клетки) и лейкоциты-пассажиры, пассивно перенесенные с трансплантатом, а также вялотекущее воспаление, часто вирусной этиологии, от которого аллогенная роговица практически ничем не защищена. Традиционно в офтальмологии для профилактики помутнения трансплантата проводят медикаментозную

иммуносупрессивную терапию препаратами из группы глюкокортикоидов и циклоспорина А. Однако местное применение препаратов этих групп ограничено из-за отсутствия «глазных лекарственных форм», а при системном и длительном применении – возникновением ряда нежелательных побочных эффектов. Кроме того, известно, что около 46% лиц в группе кератопластики высокого риска являются абсолютно резистентными к применению как местной, так и системной иммуносупрессивной фармакотерапии [1].

Неудовлетворенность результатами современной медикаментозной иммуносупрессии стимулировала поиск новых методов подавления в организме эффекторных иммунных реакций, в том числе путем активации предсуществующих (филогенетических)

*Борзенко Сергей Анатольевич* – д. м. н., заведующий Центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России; профессор кафедры глазных болезней ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация. *Онищенко Нина Андреевна* – д. м. н., профессор, заведующая лабораторией клеточных технологий ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, Москва, Российская Федерация. *Тонаева Хадиджат Джанхуватовна* – врач-офтальмолог, заведующая Глазным тканевым банком ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. *Кобах Юрий Алексеевич* – к. м. н., заведующий лабораторией трансплантологии и клеточной биологии того же учреждения. *Ковшун Евгения Владимировна* – к. м. н., врач-офтальмолог отдела трансплантологии и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока того же учреждения. *Струсова Наталья Александровна* – к. м. н., старший научный сотрудник научно-педагогического центра того же учреждения.

**Для корреспонденции:** Тонаева Хадиджат Джанхуватовна. Адрес: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59а.

Тел.: 8 (499) 488-84-05; 8 (905) 515-66-11. E-mail: tonxd15@gmail.com.

*Borzenok Sergey Anatolievich* – head of the Center for fundamental and applied biomedical problems FSBI «IRTC «Eye Microsurgery» Acad. S.N. Fedorov» Ministry of Health of Russian; prof. of the Department of Ophthalmology SEI HPE «Moscow State Medical and Dental University. A.I. Evdokimov» of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation. *Onishchenko Nina Andreevna* – prof., Head of the Cell technology Lab «V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs», Moscow, Russian Federation. *Tonaeva Khadizhat Dzhankhuvatovna* – ophthalmologist, Head of Eye Tissue Bank of FSBI «IRTC «Eye Microsurgery» Acad. S.N. Fedorov» Ministry of Health of Russian. *Komakh Yuri Alekseevich* – Head of the Laboratory of Transplantation and Cell Biology at the same Institute. *Kovshun Evgenia Vladimirovna* – ophthalmologist Department of transplantation and optico-reconstruction surgery anterior segment of the eye at the same Institute. *Strusova Natalia Alexandrovna* – senior research fellow and teaching center at the same institute.

**For correspondence:** Tonaeva Khadizhat Dzhankhuvatovna. Address: Russia, 127486, Moscow, Beskudnikovsky Boulevard, 59a.

Tel.: 8 (499) 488-84-05; 8 (905) 515-66-11. E-mail: tonxd15@gmail.com.

механизмов выработки естественной толерантности с помощью клеточных технологий [2]. Изучение свойств стволовых/прогениторных клеток костного мозга, и прежде всего мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), позволило установить, что они локализованы не только в костном мозге, но распределены по всему организму в виде периваскулярных стромальных элементов [3, 4] и обладают иммуномодулирующими свойствами при воздействии на клетки факторов врожденного и адаптивного иммунитета [5].

Одним из главных свойств ММСК является их низкая иммуногенность: они слабо экспрессируют HLA-молекулы I класса, не экспрессируют HLA-молекулы II класса и костимуляторные молекулы CD40, CD80 и CD86. Именно поэтому ММСК не в состоянии запустить активацию Т-эффекторных клеток и воспаление при аллогенной пересадке, а вместо иммунного ответа они формируют состояние иммунной толерантности, которое сопровождается активацией размножения Т-регуляторных клеток, устранением цитокинового дисбаланса и ингибированием процессов клеточного апоптоза, создающих условия для ускоренной регенерации и приживления аллогенных донорских трансплантатов [6].

В 2002 г. впервые было описано присутствие мезенхимальных стволовых/прогениторных клеток в глубоких слоях лимбальной зоны глазного яблока – в палисадах Фогта. Оказалось, что эти лимбальные клетки обладают фенотипом и свойствами, сходными с ММСК костного мозга, они формируют наружную тканевую нишу глаза и осуществляют регуляцию местного иммунитета, а также процессы физиологической и репаративной регенерации роговицы [7]. Для профилактики лимбальной недостаточности, а также повышения надежности и частоты прозрачного приживления трансплантатов роговицы была предложена сотрансплантация роговицы и лимбальных клеток, а в качестве лимбальных трансплантатов стали использовать как ауто- так и аллотрансплантаты [8]. Применение аллотрансплантатов лимба от доноров-трупов упрощает технику выполнения операции и расширяет возможности заготовки и использования донорского материала. Но вместе с тем присутствие в лимбальной ткани наряду с ММСК-подобными клетками клеток Лангерганса, запускающих эффекторный иммунный ответ, требует длительного применения системной иммуносупрессивной терапии. Предложенный нами способ предварительной длительной органотипической консервации (до 28 суток) лимбальных трансплантатов [9] позволяет не только снизить их иммуногенность в результате элиминации антигенпрезентирующих клеток Лангерганса и лимфоцитов-пассажира, но и активировать имму-

носупрессивные и толерогенные свойства ММСК-подобных клеток лимба.

В настоящей работе представлены результаты сотрансплантации консервированных аллогенных лимбальных трансплантатов при кератопластике высокого риска в клинике.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Характеристика пациентов

Исследование проведено на 2 группах пациентов ( $n = 69$ ), поступивших на повторную кератопластику в ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, проводимую на основании лицензии на забор, заготовку и трансплантацию трупных донорских тканей глазного яблока, выданной учреждению Минздравом Российской Федерации.

В основной группе ( $n = 36$ ) была выполнена одномоментная пересадка донорской роговицы – сквозная кератопластика (СКП) и аллогенных лимбальных трансплантатов (ЛТ), подвергнутых предварительной органотипической консервации в течение 21–28 суток по разработанному протоколу [9]. В контрольной группе ( $n = 33$ ) выполнялась только СКП.

Поскольку исследование выполнялось только на пациентах группы высокого риска развития отторжения после повторной СКП, то в качестве критерия для отбора пациентов использовался коэффициент прогноза исхода повторной кератопластики, который рассчитывали по уравнению прогноза результата сквозной рекератопластики, учитывающему клинико-anamnestические данные реципиента, результаты индивидуальных цитохимических исследований активности сукцинатдегидрогеназы и  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы в лимфоцитах периферической крови, а также показатели экспертизы качества жизни [10]. Используемое уравнение позволяет получать 3 варианта прогноза: благоприятный (коэффициент прогноза (Кп) менее 0,39), сомнительный (Кп 0,4–0,6) и неблагоприятный (Кп более 0,61). В наше исследование были отобраны пациенты с сомнительным и неблагоприятным прогнозом. Распределение пациентов из исследуемых групп по результатам проведенного клинико-цитохимического анализа представлено в таблице 1.

Для повышения надежности результатов планируемого оперативного вмешательства и уравнивания исходного состояния всем пациентам ( $n = 69$ ) перед операцией назначали курс корригирующей метаболической терапии комплексом препаратов (кофакторов и субстратов метаболических процессов), в ряде случаев повторно ( $n = 17$ ).

Таблица 1

**Прогнозирование исхода повторной кератопластики по результатам клиничко-цитохимического анализа пациентов**

Группа	«Сомнительный» прогноз (Кп 0,41–0,6)	«Неблагоприятный» прогноз (Кп ≥ 0,61)
Основная (n = 36)	25 (69%)	11 (31%)
Контрольная (n = 33)	24 (73%)	9 (27%)

Дата операции определялась после достижения благоприятного коэффициента прогноза (Кп 0,39 и ниже), свидетельствующего о положительном прогнозе биологического результата повторной СКП.

Распределение пациентов по полу, возрасту, этиологии бельма и количеству ранее выполненных кератопластик в сравниваемых группах было равноценным и представлено в табл. 2.

К моменту повторного обращения многим проводились комбинированные операции на базе СКП: у 29 реципиентов была выполнена СКП + имплантация интраокулярной линзы (42,0%); в 15 наблюдениях – СКП + антиглаукоматозная операция (21,7%) у 1 пациента – СКП + пластика радужки (1,4%); кроме того, у 8 пациентов (11,6%) была выполнена 1 СКП на парном глазу.

**Техника предоперационной подготовки лимбальных трансплантатов (ЛТ)**

Предоперационная подготовка ЛТ производилась по разработанному нами протоколу. Протокол включал хирургическое выделение (заготовку) лимбальных образцов из донорских глаз в сроки до 18 часов после смерти донора по разработанной нами технике [9]. Техника позволяет полу-

чить 5–6 ЛТ от 1 глазного яблока (соответственно, 10–12 от одного донора) в виде полосок ткани длиной до 8 мм, шириной до 2 мм и толщиной до 0,4–0,5 мм. Микро- и макроскопическая характеристика ЛТ представлена на рисунках 1 и 2. Полученные ЛТ затем подвергали органотипической консервации в течение 21–28 суток в среде Борзенка–Мороз, разрешенной для клинического применения.

Однородность клеточного состава и ММСК-подобный фенотип пролиферирующих клеток ЛТ, подвергнутых нормотермической консервации, были подтверждены методом иммунофенотипирования на проточном цитофлуориметре «FC500» (Beckman Coulter, США) с помощью программы «СХР analysis» (табл. 3).

**Техника выполнения сотрансплантации донорской роговицы и алогенных лимбальных трансплантатов**

В основной группе трансплантацию лимбальных фрагментов выполняли после завершения трансплантации роговицы. Операция состояла из следующих основных этапов:

- 1) фиксация кольца Флеринга к эписклере глазного яблока 4 швами 6-0 CoatedVicrylPolyaglactin 45 см Violetbraidedabsorbable Игла 8 мм 1/4 spatula;
- 2) последовательная сквозная трепанация роговицы реципиента и консервированной донорской роговицы трепаном диаметром 7,5 или 8,0 мм;
- 3) трансплантат роговицы уложен в подготовленное ложе в роговице реципиента, фиксирован 4 узловыми и непрерывными или узловыми погружными швами 10-0 Nylon 30 см BlackMonofilament Игла 6 мм 3/8 sidecut;

Таблица 2

**Распределение пациентов по демографическим и анамнестическим характеристикам заболевания роговицы**

Клиничко-анамнестические параметры	Реципиенты основной группы (n = 36)	Реципиенты контрольной группы (n = 33)
Возраст	56,5 ± 20,3	57,9 ± 18,7
Пол:		
мужской	22	18
женский	14	15
Количество кератопластик:		
1	3	3
2	24	24
3	8	6
4	1	–
Показания к первичной кератопластике:		
– буллезная кератопатия	17	15
– дистрофия роговицы	5	6
– посттравматический рубец	3	2
– ожог	3	3
– язва (фистула)	6	6
– кератоконус	2	1

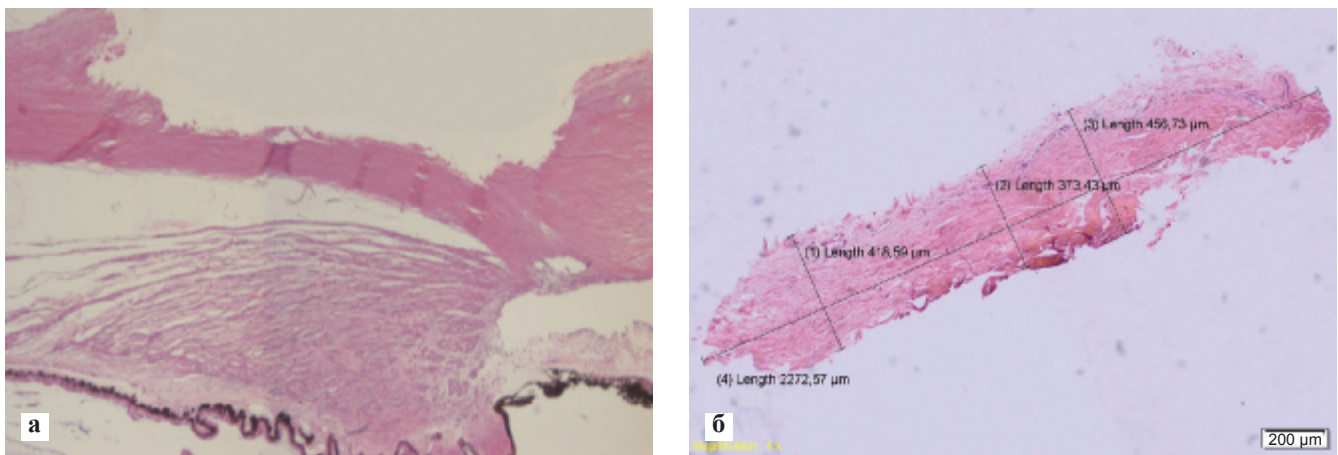


Рис. 1. Гистологические препараты глазного яблока донора-группа: а – участок склеры после иссечения лимбального трансплантата, продольный срез; б – лимбальный трансплантат с линейными размерами, поперечный срез. СМ, гематоксилин-эозин, ×50

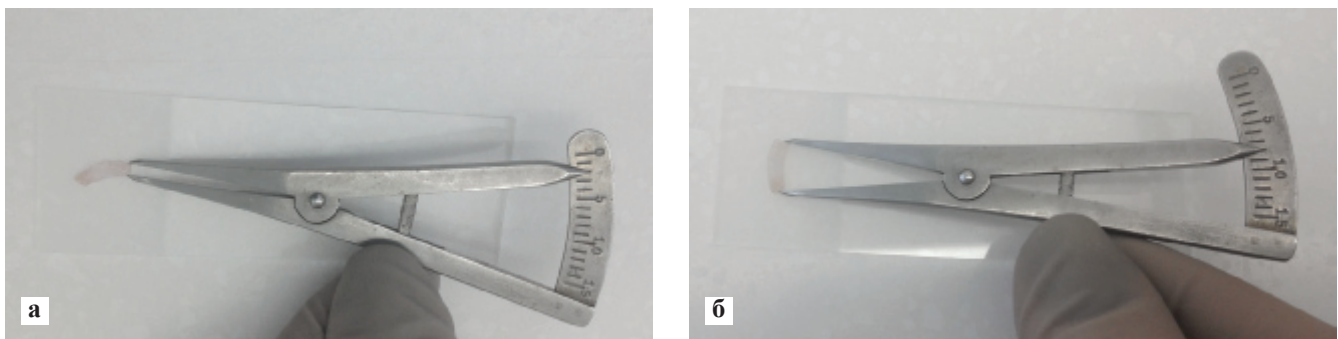


Рис. 2. Фото лимбального трансплантата: а – измерение ширины, мм; б – измерение длины, мм

Таблица 3

**Фенотипический состав клеток лимбального трансплантата на 28-е сутки органотипической консервации в исследуемых средах (%)**

Анализируемые маркеры	В среде Борзенка–Мороз	В стандартной культуральной среде	Клетки-мишени
CD14+, CD45+	9,540	3,180	
CD14+, CD45	0,260	0,200	
CD14-, CD45+	5,980	4,260	
CD14-, CD45-	84,220	92,360	
CD14+	0,680	3,980	Моноциты
CD45+	16,620	8,420	Лейкоциты
CD105+, CD11b+	4,429	3,951	
CD105+, CD11b-	95,291	95,981	ММСК
CD105-, CD11b+	0	0	
CD105-, CD11b-	0,281	0,069	
CD11b+	5,768	5,321	Лейкоциты
CD105+	99,741	99,954	ММСК
CD90+	98,883	99,906	ММСК
CD19+	3,890	1,685	В-лимфоциты
HLA-G +	88,321	93,030	
IgG-neg cont	0,186	0,092	Аутофлуоресценция

4) бульбарная конъюнктура в зоне лимба надрезана на 3, 9 и 12 часах и тупо отслоена от эписклеры, в образованные тоннели вводились аллогенные лимбальные трансплантаты с соблюдением то-

пографической ориентированности, на разрезы наложено по одному узловому шву;  
5) удалены узловые швы и фиксирующее кольцо Флеминга;

- 6) субконъюнктивально проведена инъекция 0,3 мл 0,01% дексазона и 0,3 мл 4% гентамицина;
- 7) наложена мягкая контактная линза – «ACUVUE 2 Johnson&Johnson» (диаметр 14,2 мм, радиус кривизны 8,3 мм) и монокулярная асептическая повязка.

Выполнение предложенной техники сотрансплантации лимбальных фрагментов при СКП позволило минимизировать возникновение в послеоперационном периоде асептической воспалительной реакции.

Пациенты основной и контрольной групп до и после операции получали традиционное медикаментозное лечение, разработанное и принятое в отделе трансплантологии и оптико-реконструктивной хирургии переднего отрезка глазного яблока, включающее: в инстилляциях – антибактериальные препараты (тобрекс, ципромед), стероидные препараты (0,1% раствор дексаметазона), корнеопротекторы (баларпан, 20% желе актовегина, корнергель, солкосерил) и слезозаменители (систейн, хилокомод); парабульбарные инъекции дексаметазона; внутривенные инъекции дексаметазона по 1 мл № 3.

После выписки пациента на амбулаторное лечение продолжали антибактериальную терапию (инстилляцию тобрекса и ципромед) до 6 недель, местную стероидную терапию (0,1% раствор дексаметазона) продолжали в течение 8 недель по схеме (убывание). Инстилляцию заменителей слезной жидкости, средства, улучшающие регенерацию роговицы (баларпан, корнергель, актовегин, хило-комод), продолжали до 10–12 месяцев после операции.

Следует отметить, что ни в контрольной, ни в основной группах иммуносупрессивная терапия препаратами циклоспорина А не проводилась.

### Методы оценки результатов кератопластики

1. Оценка степени выраженности воспалительных реакций в раннем послеоперационном периоде, которые в значительной степени обусловлены операционной травмой, проводилась по классификации Э.В. Егоровой и Э.И. Захаровой (1974) [11], согласно которой ранние воспалительные реакции глаза имеют 4 степени тяжести.

2. Клиническую оценку результатов сквозной кератопластики (прозрачное приживление или помутнение роговицы) проводили в течение 1 года методом биомикроскопии, используя щелевую лампу («Orpton», Германия).

Поскольку прозрачное приживление трансплантата роговицы напрямую зависит от его эндотелиальных клеток (ЭК) (их способности обеспечивать нормальную гидратацию, транспортную или насосные функции), то динамическое измерение

плотности ЭК позволяет получить количественные данные о сохранности ЭК и прогнозировать исход кератопластики [13]. Плотность ЭК в трансплантатах роговицы после кератопластики измеряли с помощью бесконтактного эндотелиального микроскопа (Торсон, SP-1000, Япония), путем автоматического подсчета клеток в единице площади.

3. Цитокиновый статус – провоспалительные (IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) и противовоспалительные (IL-10, IL-1RA, TGF $\beta$ ) цитокины и HLA-G5 в слезной жидкости – исследовали с целью определения способности консервированных аллогенных ЛТ проявлять при сотрансплантации свои толерогенные и иммуномодулирующие свойства, а также ингибировать процессы апоптоза ЭК и способствовать прозрачному приживлению роговицы. Цитокины и HLA-G5 определяли методом твердофазного ИФА с использованием отечественных наборов (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) и моноклональных антител HLA-G5 (ab 76869, Abcam, UK).

Результаты морфометрического подсчета клеток и определения содержания цитокинов были подвергнуты статистической обработке с помощью программы Statistica 6.0 с использованием t-критерия по Стьюденту, достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка выраженности воспалительной реакции в глазу по классификации Э.В. Егоровой и Э.И. Захаровой [11] на ранних сроках после сквозной кератопластики (1–4-е сутки) в контрольной и основной группах не выявила достоверных различий между этими группами (табл. 4).

Таблица 4

**Выраженность ранней послеоперационной воспалительной реакции в основной и контрольной группах пациентов с повторными СКП**

Степень операционной травмы	Основная группа (СКП+ЛТ) (n = 36)	Контрольная группа (СКП) (n = 33)
I	22 (61,1%)	20 (60,6%)
II	14 (38,9%)	13 (39,4%)

Степень послеоперационной воспалительной реакции в группах исследования была незначительной (I–II), и несмотря на расширенную интраоперационную рану в основной группе, связанную с подсадкой ЛТ, развитие воспалительной реакции не было более выраженным и не встречалось чаще. Выраженных и тяжелых воспалительных реакций (III–IV степени) у пациентов в обеих группах не отмечалось.

Клиническая оценка исхода СКП выполнялась по биологическому результату приживления трансплантата роговицы в сроки до одного года после операции. Применение для этих целей метода биомикроскопии позволило установить, что прозрачное состояние трансплантата в процессе динамического наблюдения в течение года сохранялось у 31 (86,1%) из 36 реципиентов основной группы, тогда как в контрольной группе – только у 23 из 33 (69,7%). При этом помутнение трансплантата в основной группе зафиксировано у двух реципиентов на сроке 6 месяцев и у трех – к 12 месяцам наблюдения, в то время как в контрольной группе у двух реципиентов трансплантат помутнел уже к 3-му месяцу наблюдения, у трех – к 6 месяцам и еще у пяти – к концу года наблюдения (табл. 5).

Таким образом, наше исследование показало, что доля прозрачного приживления трансплантатов роговицы в основной группе была выше – 86,1% по сравнению с 69,7% в контроле, и эта разница составила 16,4%.

Исследование плотности эндотелиальных клеток (ПЭК) в трансплантатах роговицы также проводилось в течение 1 года. При исходных среднестатистических данных в отобранных донорских роговицах  $2787,5 \pm 3,5$  кл/мм<sup>2</sup> по мере увеличения сроков наблюдения за состоянием роговицы после трансплантации потеря ЭК у пациентов в контрольной группе была выше и достигала 23,8% к концу срока наблюдения, тогда как у пациентов в основной группе процесс потери ЭК был менее выраженным и к 12 месяцам составил 14,1%.

Таким образом, более высокий процент прозрачного приживления донорской роговицы в основной группе имел место в условиях сохранения достоверно более высокой плотности ЭК в трансплантатах по сравнению с контролем (отсутствие лимбальной сотрансплантации), и эта разница через 12 месяцев наблюдения составила 9,7%.

Полученные результаты приживления трансплантатов роговицы у пациентов основной группы, которым проводилась СКП+ЛТ, по сравнению с контролем (СКП) коррелируют с динамическим изменением содержания про- и противовоспалительных цитокинов в слезной жидкости оперированного глаза у пациентов основной и контрольной групп.

Было обнаружено, что при одинаковом содержании провоспалительных цитокинов в слезной жидкости реципиентов до операции и практически равнозначном уровне их на 1, 4 и 7-е сутки после операции к 30-м суткам в основной группе реципиентов (СКП+ЛТ) происходит постепенное снижение их концентрации, а к 90-м суткам содержание исследуемых цитокинов стало достоверно ниже ( $p < 0,05$ ), чем у реципиентов контрольной группы (СКП): IL-6 ( $64,6 \pm 10,8$  и  $130,7 \pm 6,5$  пг/мл), IFN $\gamma$  ( $87,1 \pm 16,3$  и  $169,4 \pm 20,9$  пг/мл) и TNF $\alpha$  ( $27,2 \pm 3,4$  и  $47,6 \pm 6,5$  пг/мл) соответственно.

При динамическом изучении содержания противовоспалительных цитокинов в слезной жидкости нами было установлено постепенное увеличение их концентрации в группе реципиентов с сотрансплантацией (СКП+ЛТ), в то время как в контрольной группе (СКП) их уровень оставался достоверно

Таблица 5

**Результаты приживления роговицы после сквозной кератопластики в группах пациентов в течение 12 месяцев наблюдения**

Группы	Исход приживления трансплантатов роговиц	Количество оперированных глаз		
		Срок развития реакции несовместимости		
		3 месяца	6 месяцев	12 месяцев
Основная (n = 36)	Прозрачный	36 (100%)	34 (94,4%)	31 (86,1%)
	Мутный	–	2 (5,6%)	5 (13,9%)
Контрольная (n = 33)	Прозрачный	31 (93,3%)	28 (84,8%)	23 (69,7%)
	Мутный	2 (6,7%)	5 (15,2%)	10 (30,3%)

Таблица 6

**Изменение плотности эндотелиальных клеток в трансплантатах роговицы в группах пациентов за 12 месяцев наблюдения (кл/мм<sup>2</sup>)**

Группы	Исходная ПЭК	Сроки наблюдения			
		1 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
Основная	$2783,9 \pm 90,9$ (n = 36)	$2621,2 \pm 78,4$ (94,1%) (n = 36)	$2574,0 \pm 91,9$ (92,5%) (n = 36)	$2496,3 \pm 107,9$ (89,7%) (n = 34)	$2391,8 \pm 91,1^*$ (85,9%)* (n = 31)
Контрольная	$2791,0 \pm 85,4$ (n = 33)	$2497,2 \pm 97,8$ (89,5%) (n = 33)	$2389,4 \pm 97,4$ (85,6%) (n = 31)	$2245,2 \pm 99,8$ (80,4%) (n = 28)	$2128,2 \pm 98,7$ (76,2%) (n = 23)

Примечание. \* – различия достоверны по сравнению с контролем на том же сроке наблюдения,  $p < 0,05$ .

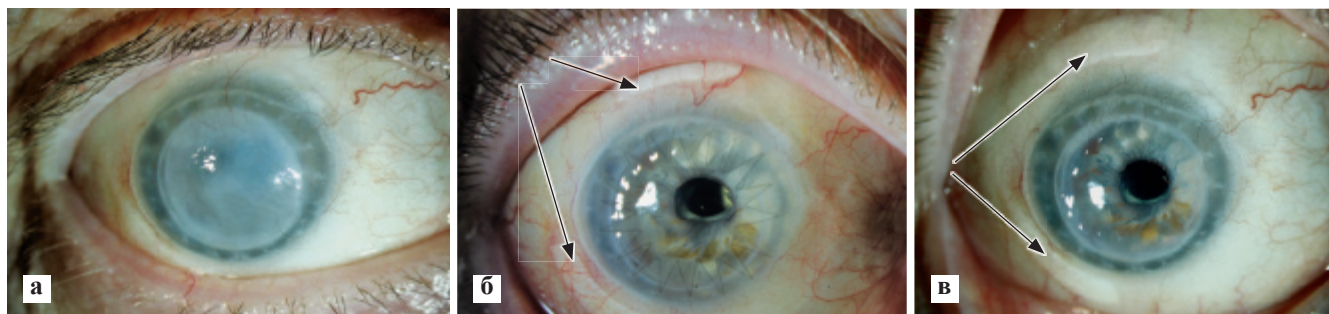


Рис. 3. Клинический пример прозрачного приживления трансплантата роговицы при сотрансплантации с лимбальными трансплантатами при кератопластике высокого риска. Состояние правого глаза пациентки Г., 67 лет: а – до операции; б – через 3 месяца после операции; в – через 12 месяцев после операции

низким, и к 90-м суткам наблюдения их соотношение составляло для TGFβ  $259,1 \pm 19,4$  и  $106,4 \pm 15,1$  пг/мл ( $p < 0,001$ ), для IL-1RA  $816,5 \pm 102,1$  и  $251,4 \pm 48,3$  пг/мл ( $p < 0,001$ ) и для IL-10  $45,6 \pm 4,1$  и  $22,6 \pm 2,3$  пг/мл ( $p < 0,001$ ) соответственно.

Исследование содержания растворимой молекулы толерогенности HLA-G5 в слезной жидкости реципиентов обеих групп при исходном равнозначном уровне  $38,5 \pm 2,7$  нг/мл в группе СКП+ЛТ и  $39,2 \pm 2,4$  нг/мл в контроле (СКП) показало увеличение концентрации к 90-м суткам наблюдения в группе реципиентов с сотрансплантацией по сравнению с группой СКП –  $89,4 \pm 7,4$  нг/мл и  $38,7 \pm 6,2$  нг/мл соответственно ( $p < 0,05$ ).

Ниже мы приводим клинический пример прозрачного приживления роговицы при сотрансплантации с лимбальными трансплантатами у пациентки с кератопластикой высокого риска (рис. 3).

### Пример 1

Пациентка Г., 67 лет. Диагноз: OD (правый глаз) – истинное приживление кератотрансплантата, с законченным процессом ремоделирования, но с тотальным помутнением всех слоев, артификация. Из анамнеза: OD – буллезная кератопатия; 2009 г. – сквозная кератопластика OD; 2011 г. – помутнение трансплантата роговицы OD.

Операция: OD – одномоментная сквозная кератопластика и трансплантация аллогенных лимбальных фрагментов, прошедших стадию органотипической консервации по разработанному протоколу. Трансплантировано 2 лимбальных фрагмента (показаны стрелками)

VisOD до операции = 0,01 не корригирует.

VisOD через 12 мес после операции = с коррекцией 0,8.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов клинической сотрансплантации роговицы и лимбальных клеток при

кератопластике высокого риска позволяет прийти к заключению, что подвергнутые длительной органотипической консервации до 21–28 суток ЛТ сохраняют свою жизнеспособность и после трансплантации, так как проявляют местную иммунорегуляторную активность. По нашему мнению, подавление местных эффекторных иммунных реакций при сотрансплантации донорских роговиц с ЛТ создает благоприятные условия для восстановления трофики в трансплантате роговицы и ингибирования процессов клеточного апоптоза.

Следствием иммунорегуляторного воздействия ЛТ становится повышение через год после операции доли наблюдений прозрачного приживления роговиц до 86,1% вместо 69,7% в контроле и сохранение к этому сроку более высокой плотности эндотелиальных клеток в трансплантатах роговиц по сравнению с исходным уровнем: 85,9% вместо 76,2% в контроле.

Полученные результаты позволяют признать, что одномоментная пересадка кератотрансплантата и консервированных ЛТ повышает качество и увеличивает сроки прозрачного приживления трансплантатов роговицы, по-видимому, за счет реализации иммунорегуляторной активности ММСК-подобных клеток лимба, способствующей изменению местного провоспалительного иммунного ответа на противовоспалительный.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Борзенко С.А., Тонаева Х.Д., Онищенко Н.А., Комах Ю.А. Индукция локальной иммунной толерантности с помощью лимбальной сотрансплантации при кератопластике высокого риска (обзор литературы). *Офтальмохирургия*. 2011; 2: 85–88. Borzenok S.A., Tonaeva Kh.D., Onishchenko N.A., Komakh Y.A. Limbal co-transplantation in case of high risk keratoplasty as a method of local immune tolerance induction (review). *Ophthalmosurgery*. 2011; 2: 85–88 (in rus).
2. Salama A.D., Womer K.L., Sayegh M.H. Clinical Transplantation Tolerance: Many Rivers to Cross. *Journal of Immunology*. 2007; 178: 5419–5423.



3. Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.W., Corselli M., Park T.S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C, Teng P.N., Traas J., Schugar R., Deasy B.M., Badyrak S., Buhring H.J., Giacobino J.P., Lazzari L., Huard J., Peault B.A. Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 301–313.
4. Caplan A.I. All MSCs Are Pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 229–230.
5. Климович В.Б. Стволовые клетки как иммуномодуляторы при использовании клеточных технологий. *Клеточные технологии для регенеративной медицины*; под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богданова, А.М. Кольцовой. СПб.: Изд-во Политехнического ун-та, 2011: 62–86.  
Klimovitch V.B. The stem cells as immunomodulators using cellular technology. *Cell Technologies for Regenerative Medicine*, Ed. Pinaev G.P., Bogdanov M.S., Kol'tsova A. St. Petersburg: Publishing House of the Polytechnic University Press, 2011; 62–86 (in rus).
6. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005; 105: 1815–1822.
7. Grueterich M., Scheffer C., Tseng G. Human Limbal Progenitor Cells Expanded on Intact Amniotic Membrane ex vivo. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120: 783–790.
8. Dua H.S., Azuara-Blanco A.A. Allolimbic transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *Br. J. Ophthalmol*. 1999; 83: 414–419.
9. Борзенко С.А., Малюгин Б.Э., Тонаева Х.Д., Онищенко Н.А., Комах Ю.А., Ковшун Е.В. Способ выделения и органотипического культивирования аллогенного лимбального трансплантата. Патент РФ № 2475218 от 20.02.2013 г.  
Borzenok S.A., Malyugin B.E., Tonaeva Kh.D., Onishchenko N.A., Komakh Y.A., Kovshun E.V. A method for isolating and culturing organotypic allogeneic limbal transplant. Patent RF № 2475218 from 20.02.2013 (in rus).
10. Нарциссов П.П. Прогностические возможности клинической цитохимии. *Советская педиатрия (ежегодные публикации об исследованиях советских авторов)*. М.: Медицина, 1983: 269–274.  
Nartsissov R.P. The prognostic value of clinical cytochemistry. *Soviet pediatrics (annual publication of studies by Soviet authors)*. М.: Medical, 1983: 269–274 (in rus).
11. Егорова Э.В., Захарова Э.И. Профилактика и борьба с осложнениями в раннем послеоперационном периоде после экстракции катаракты с имплантацией интраокулярной линзы. *Опτικο-реконструктивные операции и аллопластика в офтальмологии: Научные труды*. М., 1974: 52–60.  
Egorova E.V., Zakharova E.I. Prevention and management of complications in the early postoperative period after cataract extraction with intraocular lens implantation. *Fiber-reconstructive surgery and ophthalmology alloplastica: Proceedings*. М., 1974: 52–60 (in rus).
12. Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management. 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier-Mosby. 2005; 1: 1409.

Статья поступила в редакцию 9.01.2014 г.