

© Коллектив авторов, 2020

УДК 617.713-089.843

Филиппова Е.О.^{1,2}, Кривошеина О.И.¹

Особенности проявлений экспериментально индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы и эффективность клеточной терапии заболевания

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»,
634050, г. Томск, Россия, Московский тракт, д. 2;

²Национальный Исследовательский Томский политехнический университет,
634050, г. Томск, Россия, просп. Ленина, д. 30

Введение. Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) роговицы – тяжелое, прогрессирующее заболевание, сопровождающееся хроническим отеком всех слоев ткани роговой оболочки, болевыми ощущениями и значительным снижением остроты зрения. Радикальным способом лечения ЭЭД является кератопластика, однако, любая операция сопряжена с высоким риском развития гнойных осложнений и отторжения трансплантата в послеоперационном периоде. Альтернативой радикальной хирургии является клеточная терапия. Среди клеточных популяций наиболее широко используются мононуклеарные лейкоциты крови, вырабатывающие свыше 120 видов биологически активных веществ – цитокинов. **Цель исследования** – изучение особенностей развития экспериментально индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы и оценка эффективности лечения заболевания методом наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность патологически измененной роговой оболочки. **Методика.** Исследования выполнены на 54 крысах-самцах Wistar. На 1-м этапе у всех животных моделировали ЭЭД путем повреждения и удаления эндотелиального слоя роговицы. На 2-м этапе у 6 крыс энуклеировали пораженный глаз для морфологического исследования. Остальных животных разделяли на основную группу и группу сравнения в зависимости от метода лечения: 24 крысам основной группы насаивали суспензию аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на поврежденную внутреннюю поверхность роговой оболочки, 24 крысам группы сравнения проводили инстилляции препаратов Корнерегеля 3 раза и Баларпана 2 раза в сутки. **Результаты.** Развитие ЭЭД роговицы *in vivo* подтверждалось при наружном осмотре и данными оптической когерентной томографии роговой оболочки и световой микроскопии. Наблюдалось увеличение толщины роговой оболочки за счет диффузного отека (до 382 ± 53 мкм), развитие баллонной дистрофии переднего эпителия, гидратация и местами расслоение отечной жидкостью коллагеновых волокон собственного вещества роговицы. В эксперименте *in vivo* также установлено, что механическое повреждение и удаление эндотелия роговицы сопровождается вторичной альтерацией всех ее слоев с развитием ЭЭД в течение 2 нед. На модели ЭЭД роговицы апробирован новый метод лечения заболевания, показавший значительную эффективность. Установлено, что наложение суспензии способствует быстрому (в 13,0 раз) уменьшению гидратации основного вещества роговицы к 21-м сут от начала лечения, нормализации строения переднего эпителия и уменьшения его толщины (в 1,3 раза) на 21-е сут наблюдения. **Заключение.** Результаты морфологического и инструментального исследования подтверждают эффективность использования метода наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на поврежденную внутреннюю поверхность роговой оболочки большого глаза при лечении ЭЭД роговицы.

Ключевые слова: эндотелиально-эпителиальная дистрофия роговицы; аутологичные мононуклеарные лейкоциты; регенерация; крысы.

Для цитирования: Филиппова Е.О., Кривошеина О.И. Особенности проявлений экспериментально индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы и эффективность клеточной терапии заболевания. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(1): 23-30.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.23-30

Для корреспонденции: Филиппова Екатерина Олеговна, e-mail: katerinabosix@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, Федеральной целевой программы (соглашение № 14.575.21.0140, уникальный идентификатор RFMEFI57517X0140).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.07.2019

Принята к печати 16.01.2020

Опубликована 25.02.2020

Filippova E.O.^{1,2}, Krivoshein O.I.¹**Manifestations of experimental bullous keratopathy and the effectiveness of cell therapy**¹Siberian State Medical University,
Moskovskiy Trakt Str. 2, Tomsk 634050, Russia;²National Research Tomsk Polytechnic University,
Prospekt Lenina 30, Tomsk 634050, Russia

Introduction. Bullous keratopathy is a serious, progressive disease, which involves chronic edema of the corneal tissue associated with a significant decrease in visual acuity and severe pain. Current treatment of corneal edema includes conservative and surgical methods. Keratoplasty is a radical treatment; however, this method is associated with a high risk of purulent complications and graft rejection in the postoperative period. Cell therapy is an alternative to the radical surgery. Among cell populations, the most widely used are mononuclear white blood cells producing more than 120 types of biologically active substances, such as cytokines. **The aim** was to study features of the development of experimentally-induced bullous keratopathy and to evaluate the effectiveness of treatment by layering a suspension of autologous mononuclear leukocytes on the inner surface of pathologically altered cornea. **Methods.** The study was performed on 54 Wistar male rats. At the 1st stage of experiment, bullous keratopathy was modeled on all animals by damaging and removing the corneal endothelium. At the 2nd stage of experiment the animals were divided into the main group and the comparison group based on the treatment method. In the main group ($n=24$), a suspension of autologous mononuclear leukocytes was layered on the damaged surface of the cornea; in the comparison group ($n=24$), Korneregel was instilled three times daily and Balarpan was instilled twice a day. **Results.** The development of experimental bullous keratopathy was confirmed by external examination, optical coherence tomography of the cornea, and light microscopy. Mechanical damage and removal of the corneal endothelium was associated with secondary alterations in all corneal layers with a rapid (within 2 weeks) development of bullous keratopathy. The new therapy tested on the model of corneal bullous keratopathy proved to be highly effective. The suspension layering provided a rapid (13.0 times faster than in comparison group) decrease in corneal hydration by day 21 of the treatment, improved the structure of anterior corneal epithelium, and decreased its thickness (1.3 times) by day 21 of follow-up. **Conclusion.** The study results obtained with morphological and instrumental methods confirmed the effectiveness of layering the suspension of autologous mononuclear leukocytes on the damaged inner surface of the cornea in the treatment of bullous keratopathy.

Keywords: bullous keratopathy; autologous mononuclear leukocytes; regeneration; rats.

For citation: Filippova E.O., Krivosheina O.I. Manifestations of experimental bullous keratopathy and the effectiveness of cell therapy. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 23-30. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.23-30

For correspondence: **Filippova O. Ekaterina**, Candidate of Technical Sciences, Assistant of the Department of Ophthalmology, Assistant of the Department of Histology, Cytology and Embryology of Siberian State Medical University, 2 Moscovskii tract, Tomsk, Russian Federation; Engineer of the Laboratory of Plasma Hybrid Systems of Tomsk Polytechnic University, 30 Lenin Ave, Tomsk, Russian Federation, e-mail: katerinabosix@mail.ru.

Acknowledgments. This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, the Federal Target Program (agreement No. 14.575.21.0140, unique identifier RFMEFI57517X0140).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about authors:Filippova E.O., <https://orcid.org/0000-0003-0425-1213>Krivosheina O.I., <https://orcid.org/0000-0001-7509-5858>**Received** 08.07.2019**Accepted** 16.01.2020**Published** 25.02.2020**Введение**

Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) роговицы является тяжелым, прогрессирующим заболеванием, в основе которого лежит развитие хронического отека ткани роговой оболочки, что сопровождается значительным снижением остроты зрения и выраженными болевыми ощущениями. Фундаментальные

исследования патогенеза ЭЭД роговой оболочки проводятся с помощью экспериментального моделирования *in vivo*. Известны модели заболевания после полного удаления десцеметовой мембраны роговой оболочки или введения в переднюю камеру глаза экспериментального животного 0,05% раствора хлорида бензалкония

[1-3]. Критерием успешности моделирования ЭЭД роговицы является развитие диффузного отека всех слоев оболочки с последующими дистрофическими изменениями ткани роговицы. Однако выявление ЭЭД в разработанных моделях заболевания или не соответствует патогенетическим особенностям данного процесса, как, например, при моделировании с раствором хлорида бензалкония, или результаты весьма нестабильны [1-3]. Вследствие этого многие аспекты патогенеза ЭЭД роговицы до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Тем не менее, ведущими патогенетическими факторами заболевания считаются первичные и вторичные процессы дегенеративного и инфекционного характера, приводящие к прогрессирующему и необратимому уменьшению численности клеток эндотелия роговицы (менее 500 клеток на 1 мм²) с утратой барьерной и насосной функций [4].

Лечение ЭЭД роговицы в настоящее время проводится в двух направлениях: консервативном и хирургическом. Консервативное лечение заболевания недостаточно эффективно и обеспечивает лишь кратковременный положительный результат [4-6]. Радикальным способом лечения является кератопластика, позволяющая достичь лечебного и оптического эффектов [7], однако, как всякое хирургическое вмешательство, кератопластика сопряжена с высоким риском развития гнойных осложнений и отторжения трансплантата в послеоперационном периоде [8]. В последние 2-3 десятилетия в клинической офтальмологии для коррекции воспалительно-репаративных реакций в тканях глазного яблока при различной патологии органа зрения активно используется клеточная терапия. Среди клеточных популяций наиболее широко используются мононуклеарные лейкоциты крови, вырабатывающие свыше 120 видов биологически активных веществ – цитокинов [8, 9].

Цель исследования – изучение особенностей проявлений экспериментально индуцированной ЭЭД роговицы и оценка эффективности лечения заболевания методом наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность патологически измененной роговой оболочки.

Методика

Содержание и все манипуляции, которым подвергались животные во время эксперимента, соответствовали правилам лабораторной практики, утвержденным приказом министра здравоохранения и социального развития от 23 августа 2010 г. N 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», а также с соблюдением принципов конвенции по защите позвоночных

животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 г., и директивы 86/609 ЕЭС.

Эксперименты выполнены на базе лаборатории биологических моделей ФГБОУ ВО СибГМУ. Протокол проведения эксперимента утвержден локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России от 24.11.2014, регистрационный № 3898. Исследования выполнены на 54 половозрелых крысах - самцах Wistar массой 250 г. На I этапе эксперимента у всех животных моделировали ЭЭД повреждением и удалением эндотелиального внутреннего слоя роговицы одного из глаз (54 глаза). На II этапе апробировали новый метод хирургического лечения ЭЭД роговицы, разработанный на основе выявленных закономерностей развития заболевания, и проводили оценку его эффективности в сравнении с традиционной фармакотерапией.

Для воспроизведения ЭЭД роговицы в условиях операционной под общей анестезией всем животным (54 крысы) с помощью иглы калибра 25 G, заостренный конец которой загнут под углом 90 градусов, повреждали и удаляли эндотелиальный слой роговой оболочки одного из глаз. На II этапе эксперимента через 2 нед после развития ЭЭД роговицы в зависимости от планируемого лечения животные были разделены на 2 группы: основную и группу сравнения. В условиях операционной животным основной группы (24 крысы) под общей анестезией в периферических отделах роговицы большого глаза выполняли два парацентеза, в один из которых устанавливали ирригационную систему с подачей стерильного воздуха в переднюю камеру. Через второй парацентез в переднюю камеру большого глаза на границе между внутренней поверхностью роговицы и воздухом с помощью шприца вводили 0,5 мл суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови, аккуратно наслаивая ее на поврежденную внутреннюю поверхность роговой оболочки. Далее ирригационную систему удаляли, края парацентезов гидратировали.

Мононуклеарные лейкоциты экспериментальных животных выделяли из крови методом фракционирования в градиенте плотности на разделяющем растворе фиколл-верографин (плотность 1,067-1,077 г/мл). Чистота клеток составляла 96-98%, процент окрашенных (погибших) клеток составлял 1,5-2%, что не превышало допустимое (не более 3%) количество.

Животным группы сравнения (24 крысы) проводили консервативное лечение (инстилляций Корнерегеля 3 раза в сутки, Баларпана 2 раза в сутки).

Общая продолжительность эксперимента составила 35 сут. Через 2 нед после развития ЭЭД роговицы,

на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сут от начала лечения проводили наружный осмотр животных обеих групп, выполняли оптическую когерентную томографию роговицы (ОКТ), а также выводили из эксперимента по 6 животных с последующей энуклеацией поврежденного глаза для морфологического исследования. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по методу Ван Гизона с последующей микроскопией при 50-, 200- и 400-кратном увеличении. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета IBM SPSS Statistics 20. Нормальность распределения показателей проверяли при помощи закона Колмогорова-Смирнова. В связи с несоответствием распределения данных нормальному закону распределения использовали непараметрический критерий Уилкоксона. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

По данным наружного осмотра первые признаки экспериментально индуцированной дистрофии роговой оболочки в виде диффузного отека и помутнения роговицы в сочетании со светобоязнью, слезотечением и расширением сосудов конъюнктивы больного глаза обнаруживались у всех 54 животных уже через 2 нед после моделирования заболевания.

Данные наружного осмотра подтверждались результатами ОКТ роговицы больного глаза: у всех экспериментальных животных (54 крысы) отмечалось утолщение роговой оболочки за счет диффузного отека до 382 ± 53 мкм при нормальном показателе толщины роговицы здоровой крысы 160 мкм (рис. 1, А).

Гистологические исследования, проведенные у 6 животных через 2 нед после моделирования ЭЭД роговицы, позволили верифицировать заболевание: в 100% случаев через 2 нед после моделирования заболевания при световой микроскопии в переднем эпителии роговой оболочки выявлялись признаки баллонной дистрофии (вакуолизация цитоплазмы, гиперхромия ядер). Количество дистрофически измененных эпителиоцитов составляло $21,1 \pm 1,0$ клеток в поле зрения. Толщина переднего эпителия роговицы находилась в пределах $39,3 \pm 0,5$ мкм при нормальном значении данного показателя у здоровых крыс $28 \pm 2,8$ мкм ($p < 0,05$). Собственное вещество роговой оболочки было представлено резко гидратированными и местами расслоенными отечной жидкостью коллагеновыми волокнами. Общая площадь тканевых щелей в строме роговицы составляла 593 ± 12 мкм². Задняя пограничная мембрана была неравномерно утолщена, эндотелий роговицы отсутствовал на всем протяжении.

После инструментального и морфологического подтверждения диагноза ЭЭД роговой оболочки переходили к II этапу эксперимента.

Согласно данным наружного осмотра, уже на 3-и сут от начала лечения у 22 животных (92%) основной группы после наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговой оболочки отмечалось существенное уменьшение светобоязни, блефароспазма и слезотечения. У 20 животных (83%) было зафиксировано уменьшение отека роговицы больного глаза. Полное рассасывание отека и восстановление прозрачности роговой оболочки происходили в основной группе на 21-е сут (рис. 1, Б) после вмешательства, в то время как в группе сравнения у всех крыс на протяжении 35 сут эксперимента сохранялись диффузный отек роговой оболочки, светобоязнь и слезотечение.

Показатели ОКТ роговицы больных глаз животных коррелировали с данными наружного осмотра. До лечения у животных обеих групп отмечалось увеличение толщины роговицы с экспериментально индуцированной ЭЭД в 2,4 раза по сравнению с нормой. На 7-е сут от начала лечения у животных обеих групп отмечались признаки уменьшения отека роговицы больного глаза, происходившего, однако, более быстрыми темпами в основной группе (табл. 1, рис. 1).

На 14-е сут от начала лечения показатель толщины роговицы больного глаза по данным ОКТ у животных основной группы уменьшился в 1,7 раза от показателя «до лечения» ($p < 0,05$), в то время как у животных группы сравнения, получавших консервативное лечение — лишь в 1,1 раза ($p > 0,05$) (табл. 1). На 21-е сут от начала лечения у животных основной группы после наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговицы показатель толщины роговой оболочки больного глаза фактически приближался к нормальному значению, сократившись в 2,02 раза от уровня до лечения ($p < 0,05$). У животных группы сравнения, получавших консервативное лечение, показатель толщины роговицы больного глаза, по данным ОКТ, на 21-е сут уменьшился только в 1,3 раза ($p < 0,05$) (табл. 1).

Проведенные гистологические исследования также показали эффективность нового метода лечения ЭЭД роговицы. До начала лечения у животных обеих групп (54 крысы) в переднем эпителии роговой оболочки больного глаза обнаруживались дистрофически измененные клетки (до $21,1 \pm 1,0$ клеток в поле зрения). На 3-и сут от начала лечения у животных основной группы отмечено уменьшение количества дистрофических эпителиоцитов в 1,7 раза от исходного уровня ($p < 0,05$), на 7-е сут данный показатель уменьшился в 2,2 раза

($p < 0,01$), на 14-е сут – в 6,8 раза ($p < 0,01$) соответственно (табл. 2). На 21-е сут после проведенного лечения передний эпителий роговицы больного глаза у животных основной группы, по данным световой микроскопии, имел нормальное строение. У животных группы сравнения уменьшение количества дистрофических клеток переднего эпителия роговицы больного глаза в 1,4 раза от исходного уровня выявлено только на 7-е сут консервативного лечения ($p > 0,05$) (табл. 2). На 14-е сут данный показатель в группе сравнения уменьшился 1,7 раза от первоначального значения ($p < 0,05$), на 21-е сут – в 7,5 раз соответственно ($p < 0,05$) (табл. 2).

Нормализация толщины переднего эпителия роговицы больного глаза у животных основной группы начиналась на 14-е сут после лечения новым хирургическим методом (табл. 2), сократившись в 1,2 раза ($p > 0,05$) от исходного уровня. На 21-е сут данный показатель уменьшился в 1,3 раза от исходного уровня ($p < 0,05$) (табл. 2). В группе сравнения нормализация толщины переднего эпителия роговицы больного глаза начиналась только на 21-е сут, сократившись в 1,1 раза от первоначального уровня ($p > 0,05$) (табл. 2).

Уменьшение отека собственного вещества роговицы больного глаза у животных основной группы выявлялось уже на 3-и сут после наложения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность патологически измененной роговой оболочки (табл. 2). На 7-е сут данный показатель в основной группе статистически значимо сократился в 1,7 раза, $p < 0,05$ от исходного (593 ± 12 мкм²) уровня (рис. 2), на 14-е сут – в 3,04 раза (рис. 3) и на 21-е сут – в 13,0 раз ($p < 0,01$) соответственно (табл. 2).

У животных группы сравнения, получавших консервативное лечение, уменьшение отека собственного вещества роговицы больного глаза начиналось только на 14-е сут фармакотерапии (рис. 4), сократившись в 1,4 раза от исходного уровня и статистически значимо на 21-е сут – в 2,0 раза ($p < 0,05$) (табл. 2).

Обсуждение

Таким образом, воспроизведение в эксперименте *in vivo* ЭЭД роговицы путем повреждения и удаления эндотелиального слоя роговой оболочки сопровождается вторичной альтерацией остальных слоев ткани с

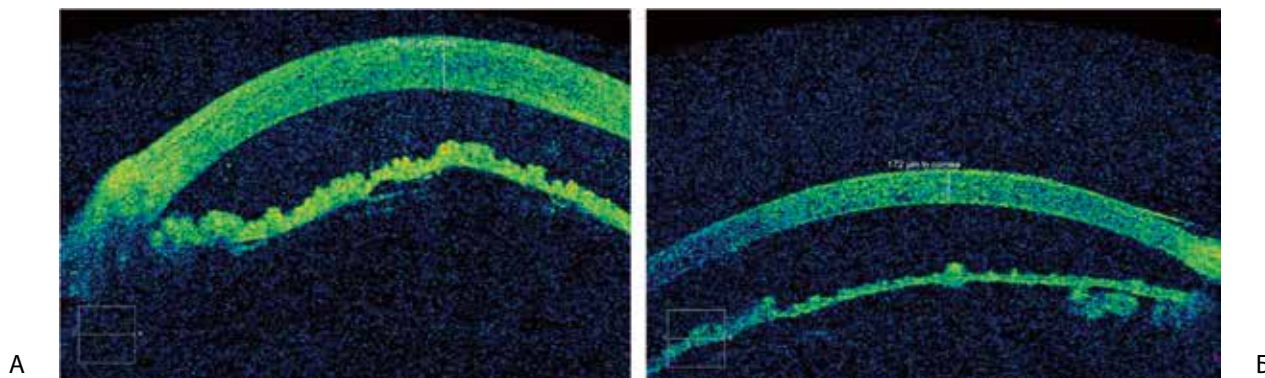


Рис. 1. Результаты оптической когерентной томографии роговицы экспериментального животного основной группы с индуцированной ЭЭД роговой оболочки. А – отек и утолщение среза роговицы на 7-е сут лечения (наложения на внутреннюю поверхность роговой оболочки суспензии аутологичных лейкоцитов); Б – восстановление прозрачности и толщины среза роговицы на 21-е сут лечения.

Таблица 1

Динамика толщины роговицы (мкм) у животных с экспериментально индуцированной ЭЭД роговой оболочки в зависимости от метода лечения, М \pm т

Группы исследования	До лечения	Сроки наблюдения			
		3-и сут	7-е сут	14-е сут	21-е сут
Основная группа (n = 24)	382,0 \pm 1,3	360,0 \pm 1,3	305,0 \pm 1,2 *	221,0 \pm 1,2 **	189,0 \pm 1,2 **
Группа сравнения (n = 24)	381,0 \pm 1,3	366,0 \pm 1,3	357,0 \pm 1,2	329,0 \pm 1,2*	301,0 \pm 1,2*

Примечание. * – уровень значимости различий по сравнению с исходными данными $p < 0,01$; ** – уровень значимости различий по сравнению с исходными данными $p < 0,05$. Толщина роговицы глаза у здоровых крыс – 160 мкм.

быстрым (в течение 2 нед) развитием заболевания. При этом сроки развития инструментальных и морфологических признаков экспериментально индуцированной ЭЭД роговицы сопоставимы с таковыми при спонтанном течении заболевания в клинической практике. Это свидетельствует об адекватности разработанной модели ЭЭД роговой оболочки у крыс-самцов Wistar. Можно предположить, что в условиях отсутствия эндотелия роговицы внутриглазная жидкость, диф-

фундируя в строму, способствует дезорганизации ткани основного вещества роговой оболочки с последующей деструкцией коллагеновых волокон. Прогрессирование отека на субклеточном уровне, вероятно, сопровождается повреждением митохондрий и рибосом, разрушением лизосом и высвобождением ферментов. Как следствие, развивается ацидоз с увеличением дисперсности коллоидов и повышением их способности притягивать и удерживать воду. В строме

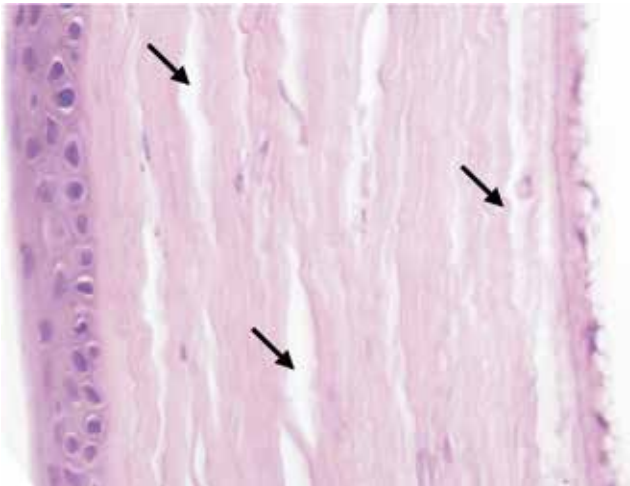


Рис. 2. Отек собственного вещества роговицы (косые стрелки) экспериментального животного основной группы с индуцированной ЭЭД роговой оболочки на 7-е сут после наложения суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговицы. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 200$.

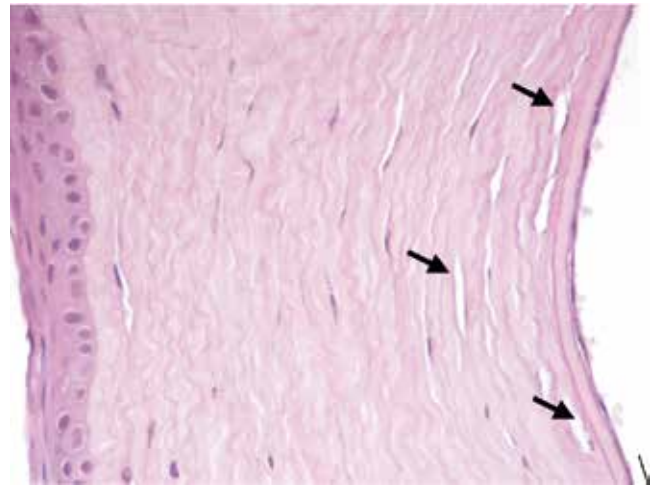


Рис. 3. Незначительный отек собственного вещества роговицы (косые стрелки) у экспериментального животного основной группы с индуцированной ЭЭД роговицы на 14-е сут после наложения суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговой оболочки. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$.

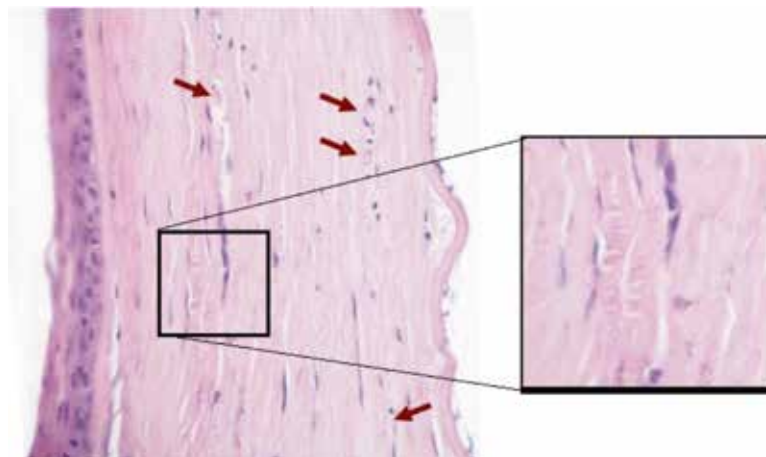


Рис. 4. Дистрофически измененные клетки (стрелки), деструкция коллагеновых волокон (ув. $\times 400$) у экспериментального животного группы сравнения с индуцированной ЭЭД роговицы на 14-е сут от начала консервативного лечения. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 100$ и $\times 400$.

Таблица 2

Динамика морфометрических показателей роговицы животных с экспериментально индуцированной ЭЭД роговой оболочки в зависимости от метода лечения (M±m)

Группы исследования	Сроки эксперимента	Морфометрические показатели		
		Количество дистрофических клеток переднего эпителия	Толщина переднего эпителия, мкм	Площадь отека роговицы, мкм ²
Основная группа (n = 24)	3-и сут	12,1± 0,1**	37,5± 1,4	475± 23
	7-е сут	9,4± 0,2*	35,6± 2,3	349± 23**
	14-е сут	3,1± 0,4*	31,6± 2,1	195± 14*
	21-е сут	0,1± 0,1*	30,8± 1,9*	45± 10*
Группа сравнения (n = 24)	3-и сут	20,0± 1,3	38,1± 1,8	589± 33
	7-е сут	15,3± 1,4	37,9± 0,9	534± 26
	14-е сут	12,5± 0,2	37,3± 0,8	430± 23
	21-е сут	2,8± 0,2	35,7± 0,7	290± 19

Примечание. * – уровень значимости различий по сравнению с группой сравнения $p < 0,01$; ** – уровень значимости различий по сравнению с группой сравнения $p < 0,05$.

роговицы нарастает уровень содержания Na^+ и K^+ , прогрессирует гиперосмия, что способствует усилению отека и вторичным дистрофическим изменениям всех слоев роговой оболочки.

Наслоение суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю, лишенную эндотелия поверхность роговицы, особенно в ранние сроки заболевания уменьшает явления отека ткани и препятствует развитию и прогрессированию гидропической дистрофии роговой оболочки.

Результаты исследований, полученных на II этапе эксперимента, показали эффективность предложенного метода лечения ЭЭД роговицы. Наслоение суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на внутреннюю поверхность роговой оболочки больного глаза способствует более быстрому уменьшению отека всех слоев роговицы, что подтверждается данными ОКТ и световой микроскопии. Согласно полученным данным, применение нового метода хирургического лечения ЭЭД роговицы способствует быстрому (в 13,0 раз) уменьшению гидратации основного вещества роговицы к 21-м сут от начала лечения, нормализации строения переднего эпителия и уменьшению его толщины (в 1,3 раза) на 21-е сут наблюдения.

Заключение

Таким образом, в эксперименте *in vivo* установлено, что механическое повреждение и удаление эндотелия роговицы сопровождается вторичной альтерацией всех ее слоев с быстрым (в течение 2 нед) развитием

ЭЭД. Результаты морфологического и инструментального методов исследования подтверждают эффективность метода наслоения суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов на поврежденную внутреннюю поверхность роговой оболочки больного глаза при лечении ЭЭД роговицы.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Филиппова Е.О., Кривошеина О.И.;

Сбор и обработка материала – Филиппова Е.О., Кривошеина О.И.;

Статистическая обработка – Филиппова Е.О.;

Написание текста – Филиппова Е.О., Кривошеина О.И.;

Редактирование – Филиппова Е.О.

Литература

1. Menegmeng Wang Effect of Glyceraldehyde Cross-Linking on a Rabbit Bullous Keratopathy Model Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Ophthalmology*. 2015; 5: 1-5.
2. Bredow L., Schwartzkopff J., Reinhard T. Regeneration of corneal endothelial cells following keratoplasty in rats with bullous keratopathy. *Molecular vision*. 2014; 20: 683-90.
3. Melles G.R.J., Wijdh R.H.J., Nieuwendaal C.P. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004; 23: 286-88.
4. Bhandari V., Reddy J.K., Siddharthan K.S. Simultaneous Descemet’s membrane endothelial keratoplasty and posterior iris-claw fixated intra ocular lens implantation (IOL) in management of aphakic bullous keratopathy. *International Ophthalmology*. 2016; 36: 305-11.

5. Acar B.T., Akdemir M.O., Acar S. Visual acuity and endothelial cell density with respect to the graft thickness in descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: One year results. *International Journal of Ophthalmology*. 2014; 7: 974-9.
6. Hirano K., Kachi S., Matsuura M., Kawase K., Park W.S. Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty for Bullous Keratopathy in Buphthalmic Eye. *Case Rep. Ophthalmology*. 2016; 7: 279-84.
7. Pereira N.C., Diniz E.R., Ghanem R.C., Cunha Filho R., Prazeres T.M., Nose W3, Forseto A.D.S. Descemet membrane endothelial keratoplasty in multifocal pseudophakic eyes. *Arq. Bras. Oftalmol.* 2018; 81 (3): 183-7.
8. Каспаров А.А., Каспарова Е.А. Фадеева Л.Л. Персонализированная клеточная терапия ранней буллезной кератопатии (экспериментальное обоснование и клинические результаты). *Вестник офтальмологии*. 2013; 5: 53-61.
9. Каспарова Е.А., Суббот А.М. Пролиферативный потенциал заднего эпителия роговицы человека. *Вестник офтальмологии*. 2013; 3: 82-8.
3. Melles G.R.J., Wijdh R.H.J., Nieuwendaal C.P. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004; 23: 286-8.
4. Bhandari V., Reddy J.K., Siddharthan K.S. Simultaneous Descemet's membrane endothelial keratoplasty and posterior iris-claw-fixated intra ocular lens implantation (IOL) in management of aphakic bullous keratopathy. *International Ophthalmology*. 2016; 36: 305-11.
5. Acar B.T., Akdemir M.O., Acar S. Visual acuity and endothelial cell density with respect to the graft thickness in descemet's stripping automated endothelial keratoplasty: One year results. *International Journal of Ophthalmology*. 2014; 7: 974-9.
6. Hirano K., Kachi S., Matsuura M., Kawase K., Park W.S. Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty for Bullous Keratopathy in Buphthalmic Eye. *Case Rep. Ophthalmology*. 2016; 7: 279-84.
7. Pereira N.C., Diniz E.R., Ghanem R.C., Cunha Filho R., Prazeres T.M., Nose W3, Forseto A.D.S. Descemet membrane endothelial keratoplasty in multifocal pseudophakic eyes. *Arq. Bras. Oftalmol.* 2018; 81 (3): 183-7.

References

1. Mengmeng Wang Effect of Glyceraldehyde Cross-Linking on a Rabbit Bullous Keratopathy Model Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Ophthalmology*. 2015; 5: 1-5.
2. Bredow L., Schwartzkopff J., Reinhard T. Regeneration of corneal endothelial cells following keratoplasty in rats with bullous keratopathy. *Molecular vision*. 2014; 20: 683-90.
8. Kasparov A.A., Kasparov E.A. Fadeeva L.L. Personalized cellular therapy of early bullous keratopathy (experimental substantiation and clinical results). *Vestnik Oftalmologii*. 2013; 5: 53-61. (in Russian)
9. Kasparova E.A., Subbot A.M. Proliferative potential of the posterior epithelium of the human cornea. *Vestnik Oftalmologii*. 2013; 3: 82-8. (in Russian)

Сведения об авторах:

Филиппова Екатерина Олеговна, канд. технических наук, ассистент каф. офтальмологии и каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Сибирского государственного медицинского университета, инженер лаб. плазменных гибридных систем Томского политехнического университета;

Кривошеина Ольга Ивановна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. офтальмологии Сибирского государственного медицинского университета.