

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Московская государственная академия  
ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»**

УТВЕРЖДАЮ

проректор по науке и инновациям,  
академик РАН

\_\_\_\_\_ Н.А. Балакирев

Кафедра анатомии и гистологии животных имени профессора А.Ф. Климова

**ОТЧЁТ**

**О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ ПО ТЕМЕ:**

«Морфофункциональное обоснование применения стволовых клеток при  
патологиях роговицы у животных».

(договор № 13-2 от 17 февраля 2016 г. с ООО «ИВЦ МВА»)

Руководитель:

Зав. кафедрой анатомии и гистологии  
животных имени профессора А.Ф. Климова,  
заслуженный деятель науки РФ,  
д.б.н., профессор

\_\_\_\_\_ Н.А. Слесаренко

## **ВВЕДЕНИЕ**

В последние десятилетия неуклонно растет число животных, страдающих офтальмопатиями различного генеза [1-12]. Среди них особое место занимают длительно незаживающие и рецидивирующие язвы роговицы. Данная патология может иметь травматическую этиологию, а также может быть вызвана снижением трофики роговицы, анатомическим лагофталмом, ожогами и многими другими факторами, приводящими к повреждению эпителия и более глубоких слоёв роговицы.

В медицине человека при тяжелых повреждениях роговицы клеточная терапия показывает обнадеживающие результаты, как в эксперименте, так и на практике, что отражено во многих современных источниках.

При этом лечение животных с заболеваниями и повреждениями роговицы глаза, при которых имеется выраженная несостоятельность процессов регенерации, приводящая в итоге к значительному снижению остроты зрения и слепоте, остается актуальной проблемой ветеринарной офтальмологии [8-19].

В настоящее время, ведется поиск эффективных способов, которые позволили бы успешно лечить пациентов с повреждениями роговицы и конъюнктивы, фиброзирующими кератоконъюнктивитами, незаживающими язвами роговицы, тяжелыми формами синдрома сухого глаза.

До сих пор большинство методов лечения находится на стадии лабораторных и клинических испытаний, но некоторые из них уже завоевали свое место в клинической практике. Как известно, стволовые клетки обладают способностью оптимизировать цитокиновый статус в клеточном микроокружении после их локальной трансплантации в органы или ткани [24, 25, 26].

Исходя из анализа литературных данных по стволовым клеткам и результатов исследований наших коллег из Федерального медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна ФМБА России (Москва), было

решено апробировать применение стволовых клеток различных типов в эксперименте при моделировании язвы роговицы у кролика.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Объектом исследования явились 30 кроликов (60 глаз) породы Серый великан, массой 2,7 – 3,0 кг, в возрасте от 8 до 10 месяцев.

Использовали комплексный, методический подход, включающий экспериментальное моделирование повреждения роговицы, офтальмическое обследование зоны повреждения, морфологические методы исследования и статистический анализ по полученным цифровым данным.

Животные были подразделены на 6 групп. Каждой группе соответствовал исследуемый тип клеток. Культуры клеток исследовали на стерильность, острую токсичность и пирогенность.

Первой группе животных инъецировали аутологичные гемопоэтические стволовые клетки.

Предварительно, у животных опытной группы был проведен общий клинический анализ крови с целью выявления индивидуальной лейкоцитарной активности в норме. Затем, в течение 4-х суток опытным животным подкожно вводили препарат «Грасальва» в дозе 10 мкг\кг в сутки. Данный препарат является стимулятором лейкопоэза. Вырабатывается лабораторным штаммом бактерии *Escherichia coli*, в которую методами генной инженерии введен ген гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека. Препарат представляет собой стерильную бесцветную жидкость для парентерального введения. Молекулярная масса 18800 Да. Активным веществом данного препарата является филграстим – рекомбинантный человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). Взаимодействуя с рецепторами на поверхности гемопоэтических клеток, он стимулирует клеточную пролиферацию, дифференцировку и функциональную активацию. Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) продуцируется моноцитами, фибробластами и эндотелиальными клетками. Г-

КСФ регулирует продукцию нейтрофилов и выход функционально активных нейтрофилов из костного мозга в кровь.

На 5-е сутки у опытных животных производили повторный клинический анализ крови для контроля активизации в ней функционально активных нейтрофилов.

Затем пунктировали ушную вену, из которой брали 30 мл крови, выделяли моноклеарную фракцию в градиенте плотности.

Моноклеарная фракция клеток периферической крови содержала стволовые клетки взрослого типа, которые способны при определенных условиях *in vitro* дифференцироваться, практически во все ткани у млекопитающих. Применение препарата Г-КСФ позволило увеличить фракцию стволовых клеток в периферической крови в 70-400 раз.

Полученные клетки представляли собой комитированные клетки – предшественники кроветворения. Доказать, что аутоклетки, полученные у кролика являются гемопоэтическими или мезенхимальными стволовыми, пока не представляется возможным. Предполагается, что сепарат крови животного, после стимуляции Г-КСФ, аналогичен по иммунному профилю человеческому, т.е. содержит гемопоэтические и мезенхимальные стволовые, мультипотентные клетки.

Далее клетки замораживали с использованием Диметилсульфоксида 5%. Полученную клеточную суспензию хранили в криопробирках при минус 196°С. В каждой пробирке содержалось не менее 2x10<sup>6</sup> Ядросодержащих Стволовых Клеток.

Перед введением клетки размораживали при 37°С, двукратно отмывали от ДМСО. Ресуспендировали в растворе NaCl 0,9%.

Второй группе животных вводили гомологичные стволовые клетки лимба;

Третьей группе животных – аутологичные стволовые клетки лимба;

Четвертой группе животных – гомологичные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани;

Пятой группе животных – аутологичные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани;

За 14 дней до проведения эксперимента у животных групп 2, 3 и 4 производили биопсию жировой и лимбальной ткани под общей анестезией для последующего выращивания стволовых клеток на питательных средах.

Жировую ткань измельчали скальпелем, инкубировали в течение 30 мин в растворе коллагеназы при 37°C, инактивировали фермент добавлением среды с сывороткой, пропускали через клеточный фильтр с диаметром пор 100 нм и дважды отмывали центрифугированием. Клеточный осадок ресуспендировали в среде, высевали на культуральные флаконы и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Через сутки отмывали от клеточного дебриса и заменяли среду на новую.

Клеточные культуры выращивали на среде MesenCult (StemCell Technology, США) с добавлением 2 мМ L-глутамин (StemCell Technology, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (StemCell Technology, США) и 10% добавки для культивирования клеток MesenCult (StemCell Technology, США).

При достижении 70–80% монослоя клеток в первичной культуре ММСК пересевали, используя 0,02% раствор трипсина с 0,05% ЭДТА (StemCell Technology, США). Плотность посадки клеток составляла 3000–5000 кл/см<sup>2</sup>. Среду во флаконах с культивируемыми клетками меняли каждые 3–4 дня. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> [23].

Так же, было проведено взятие биоптата лимба в транспортную среду содержащую антибиотик и антимикотик, транспортировка в лабораторию, ферментативная обработка в стерильных условиях и культивирование на специальных средах, способствующих экспансии стволовых клеток. Культуральную среду меняли раз в 3-4 дня, и при достижении культурой 60-

70% конfluenceности производили пассирование. Для терапии применяли клетки до 3 пассажа.

Шестой группе животных (контрольная группа) вводили физиологический раствор (Sol. Natrii Chloridi 0,9%).

Перед трансплантацией суспензию клеток тщательно отмывали от культуральной среды, подсчитывали количество жизнеспособных клеток и суспензировали в минимальном количестве физиологического раствора.

У всех животных проводили кератоэктомию под контролем операционного микроскопа фирмы Opton с коаксиальным и боковым освещением. Увеличение на разных этапах операции варьировало от '6 до '14. Для иссечения роговицы применяли трепаны диаметром 6,5мм, с дозируемой глубиной режущей кромки и шагом в 10 микрон. Для расслаивания тканей роговицы применяли лейкосапфировые округлые микролезвия. Основные моменты операции послойной кератоэктомии осуществляли по общепринятой методике, описанной Дроновым [20].

На центральную зону роговицы устанавливали трепан диаметром 7,5 мм с ограничением трепанации до 200 мкм. Лейкосапфировым расслаивателем проводили переднюю кератоэктомию в пределах трепанационной зоны. Использованное лезвие обеспечивало гладкое расслаивание роговицы без образования неровностей, что немаловажно для чистоты эксперимента. Далее, маркировали зону введения клеток на 9, 15, 6 и 12 ч. В данную зону интрастромально вводили 0,05 мл суспензированной взвеси клеток до образования роговичного инфильтрата, граничащего с зоной трепанации. В опытных группах производили субконъюнктивальную инъекцию суспензии стволовых клеток в 0,2 мл физиологического раствора. У контрольных животных в аналогичные сегменты роговицы вводили то же количество физиологического раствора (Натрия Хлорид 0,9 %) для возникновения идентичной реакции тканей роговицы на интрастромальное повреждение.

В послеоперационном периоде животные находились в защитных воротниках. Кроликам обеих групп проводили инстилляцию глазных капель "Ципровет" 4 раза в день для снятия возможных инфекционных осложнений, другие препараты не назначались вследствие обеспечения чистоты эксперимента.

Клинические методы исследования включали осмотр переднего отрезка глаз с помощью фокального и бокового освещения и биомикроскопию щелевой лампой фирмы «Shin» с флюоресцеиновой пробой и фоторегистрацией. Оценку состояния глаз проводили на 7 и 14 сутки после трансплантации по следующим признакам: степени выраженности воспалительной реакции, диаметру дефекта эпителия, интенсивности помутнения роговицы. Степень выраженности воспалительной реакции оценивали по балльной системе Ченцовой Е.В. [21] Площадь дефекта стромы роговицы определяли с помощью биомикроскопии. Интенсивность помутнения роговицы оценивали по шкале Войно-Ясенецкого [22].

На 15 день исследования животным была проведена энуклеация глазных яблок с целью выявления морфофункциональных изменений в роговице после трансплантации стволовых клеток.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### Результаты применения аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

К 14-му дню у всех исследуемых животных произошла полная эпителизация роговицы без значительных различий по степени помутнения зоны дефекта, при этом контрольные особи (рис.1б) превосходили своих аналогов из опытной группы (рис.1а) по этому признаку. В то же время у всех животных, включенных в эксперимент, имели место четкие границы зоны трепанации.



**Рис.1а.** Клиническое состояние глаза у животного на 14-е сутки после введения аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

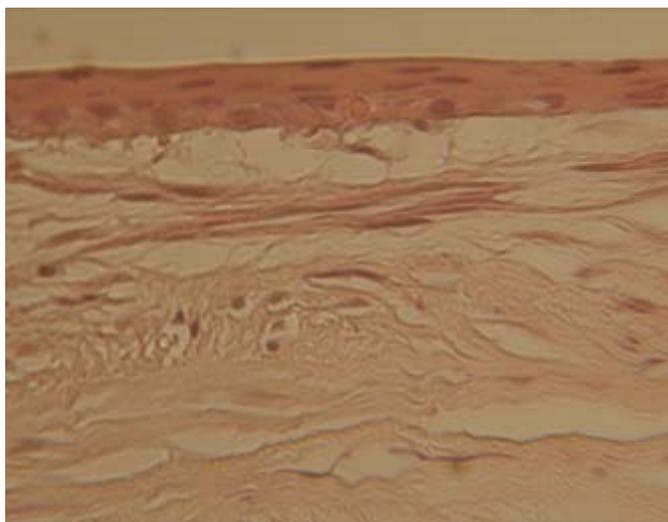


**Рис. 1б.** Клиническое состояние глаза у животного контрольной группы на 14-е сутки

Данные гистологического исследования роговицы кролика на 14 сутки после введения ауто-ГСК (рис. 2) показали, что эпителий равномерно покрывал всю поверхность роговицы, присутствовал незначительный дефект на границе нормальной и трепанационной зоны. Так же, наблюдали изменение количественного представительства слоёв эпителия до 3-4, при норме 5-6.

В непосредственной близости от места инъекции ауто-ГСК видимые изменения в строме роговицы практически отсутствовали.

В центральной области зоны дефекта отмечали скопление фибробластоподобных клеток. Синтезированный фибробластоподобный слой клеток отличался по свойствам архитектоники от подлежащей стромы: коллагеновые волокна характеризовались менее упорядоченной ориентацией и имело место наличие межволоконного отёка. Признаков ангиогенного гистогенеза обнаружить не удалось, что может свидетельствовать о пролиферативных потенциях стволовых клеток.



**Рис 2.** Микроморфологическая картина роговицы глаза опытного животного на 14-е сутки после введения ауто-ГСК. Гематоксилин и эозин. Об.40. Ок.40.

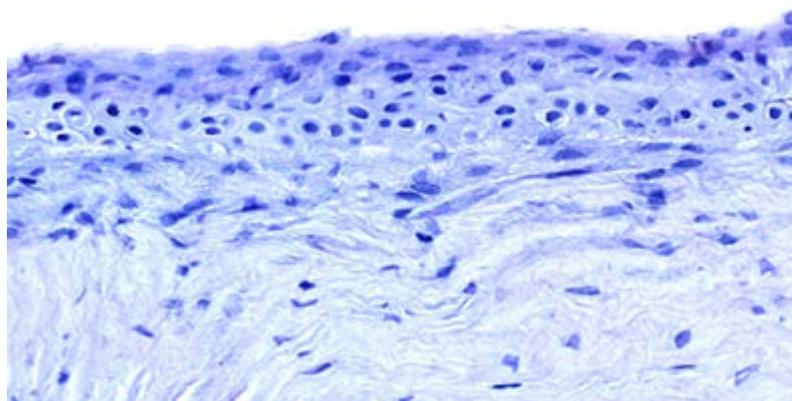
#### Результаты применения гомологичных стволовых клеток лимба

Спустя 7 суток после трансплантации данного типа клеток у животных контрольной группы в роговице глаза сохранялся поверхностный дефект стромы и в 50% – персистирующая эрозия, в то время как в опытной группе наблюдали практически полное закрытие эпителиального дефекта роговицы у всех исследуемых особей. Спустя 14 суток, в опытной группе выявлено формирование более нежного бельма роговицы по сравнению с контрольной (5 и 10 баллов по шкале Войно-Ясенецкого, соответственно). Представители контрольной группы превосходили своих аналогов из опытной по степени васкуляризации и воспалительной реакции роговичной ткани (3 и 1 балла, соответственно в контроле и 1 балл и 0 баллов в опыте) (Рис.3).



**Рис. 3.** Клиническое состояние глаза животного на 14-е сутки после введения гомологичных стволовых клеток лимба

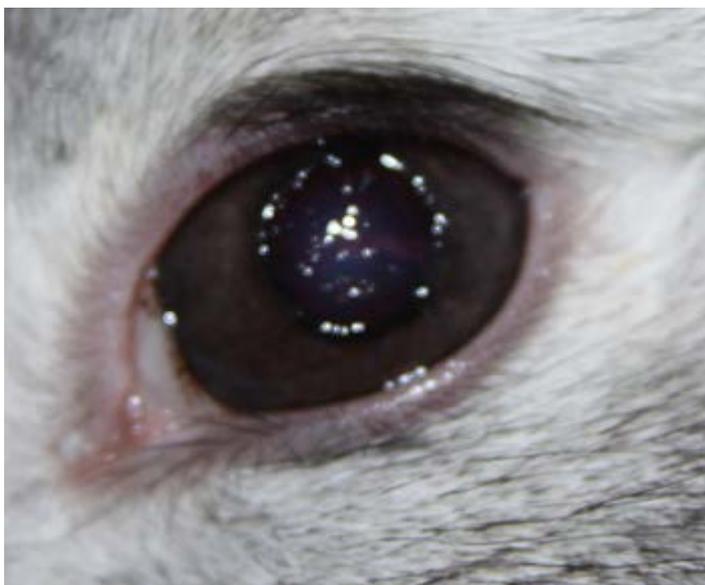
Анализ динамики морфологических изменений в ткани роговицы после введения гомологичных стволовых клеток лимба на 7 сутки показали неполное закрытие роговичного дефекта и клеточную инфильтрацию в строме. На 14 сутки, нами выявлен ряд специфических признаков, отражающих активизацию регенераторного процесса: утолщение эпителиального регенерата в краевых и центральных зонах повреждения за счет увеличения количества слоёв до 5-9. Субэпителиально наблюдали макрофагально-фибробластическую инфильтрацию и наличие крупных фибробластов с обширной цитоплазмой. Эта картина соответствует активному заживлению дефекта роговицы (Рис. 4).



**Рис.4.** Гистологическая характеристика роговицы на 14-е сутки после введения гомологичных стволовых клеток лимба.  
Толуидиновый синий. Об.40. Ок.10.

#### Результаты применения аутологичных стволовых клеток лимба

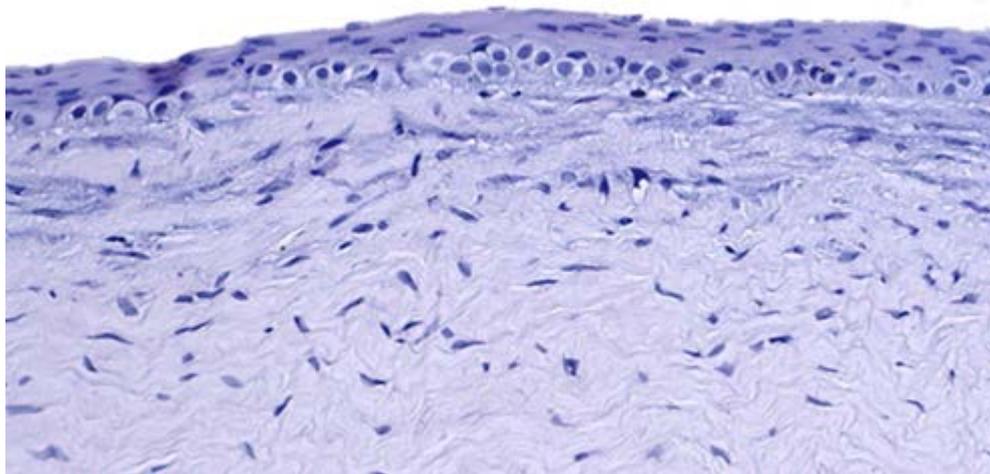
На 7 день после трансплантации аутологичных стволовых клеток лимба в роговице животных наблюдали закрытие эпителиального дефекта, в то время как в контрольной сохранялись поверхностные дефекты стромы. Контрольные животные опережали опытных по степени васкуляризации и воспалительной реакции. К 14 дню интенсивность помутнения роговицы у особей опытной группы в среднем соответствовала 7 баллам прозрачности по шкале Войно-Ясенецкого (рис.5), в то время как в контроле в большинстве случаев наблюдали помутнения, достигающие 10 баллов.



**Рис. 5.** Клиническое состояние глаза животного опытной группы на 14-е сутки после введения аутологичных стволовых клеток лимба

При оценке микрокартины заживления на 7-е сутки у большинства животных опытной группы выявлена полная эпителизация дефекта, причем количество слоёв эпителия составляло 3-4. Со стороны соединительной ткани наблюдали отёк и умеренную макрофагально-фибробластическую инфильтрацию. На 14-е сутки после введения аутологичных лимбальных стволовых клеток количество слоев клеток поверхностного эпителия возрастало до 5-8 (рис. 6), незначительная макрофагально-фибробластическая

инфильтрация сохранялась и увеличивалась биосинтезирующая активность фибробластов, что подтверждается их структурно-функциональным состоянием.



**Рис. 6.** Гистологическая характеристика роговицы на 14-е сутки после введения аутологичных стволовых клеток лимба.  
Толуидиновый синий. Об.20. Ок.10.

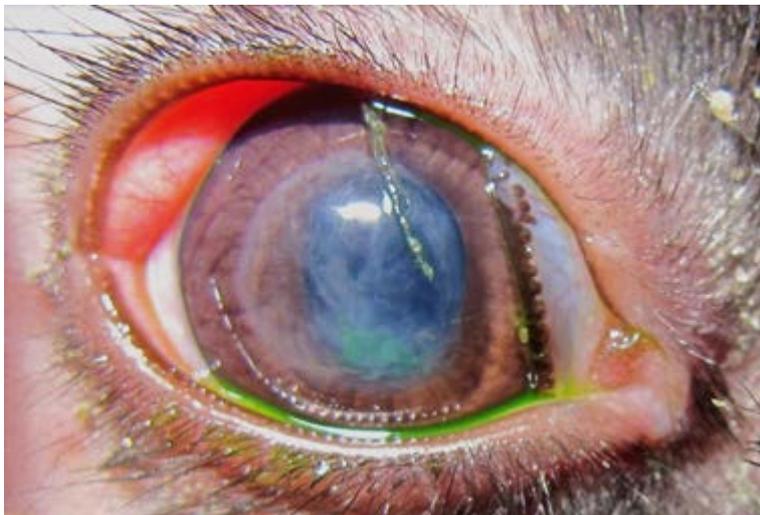
Результаты применения гомологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

На 7-е сутки после трансплантации гомологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в опытной группе животных в большинстве случаев наблюдали почти полное закрытие стромального дефекта роговицы (рис.7), в то время как в контроле сохранялись дефекты ее эпителия и стромы. Васкуляризацию у опытных особей наблюдали в 3 раза реже по сравнению с контролем. На 14-е сутки интенсивность помутнения роговицы по шкале Войно-Ясенецкого у животных опытной группы соответствовала 9 баллам, а у животных контрольной группы – 10 баллам.

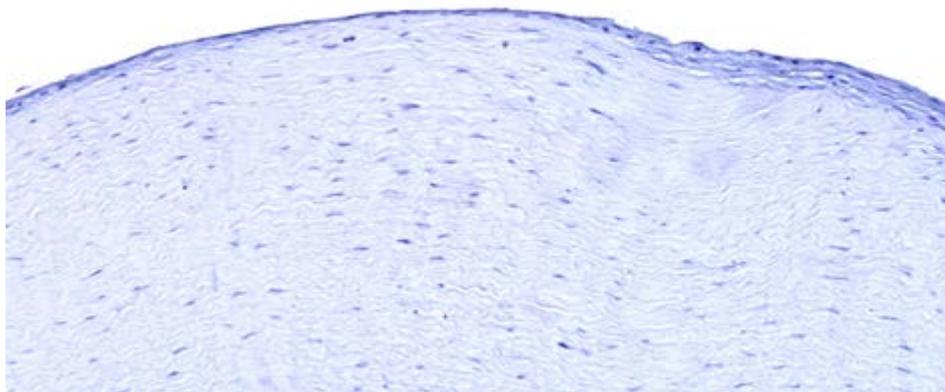
Структурное состояние роговицы глаза после введения гомологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в динамике регенераторного процесса показало, что на 7 сутки дефект полностью эпителизирован. Эпителиальный пласт состоял из 1-2 слоёв, уплощенных эпителиоцитов (рис.

8). Со стороны стромы выражен отёк, что характерно для данного срока заживления и умеренная клеточная инфильтрация.

На 14-е сутки количество эпителиальных слоёв увеличилось до 4-5, клетки приобретали кубическую форму. В строме наблюдали фибробластическую инфильтрацию.



**Рис. 7.** Клиническое состояние глаза у кролика, после введения гомо-МСКЖТ на 7-е сутки эксперимента



**Рис 8.** Гистологические особенности роговицы глаза животного на 7-е сутки после введения гомо-МСКЖТ.  
Толуидиновый синий. Об.10. Ок.10.

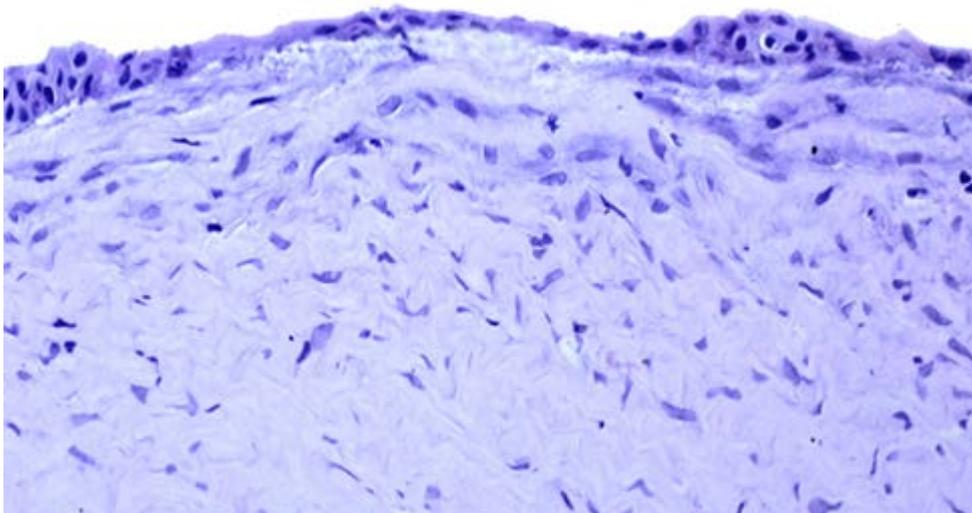
Результаты применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

К 7-му дню после трансплантации данного типа клеток в опыте наблюдали закрытие эпителиального дефекта (рис. 9), в то время как в контрольной группе в роговице сохранялись поверхностные дефекты стромы. Степень васкуляризации и воспалительной реакции преобладали в контроле в сравнении с опытом. К 14-му дню наблюдений интенсивность помутнения у опытных особей в среднем соответствовала 7 баллам прозрачности по шкале Войно-Ясенецкого, в то время как в контроле в большинстве случаев наблюдали помутнения, достигающие 10 баллов.



**Рис. 9.** Клиническое состояние глаза животного после введения ауто-МСКЖТ на 7 сутки эксперимента

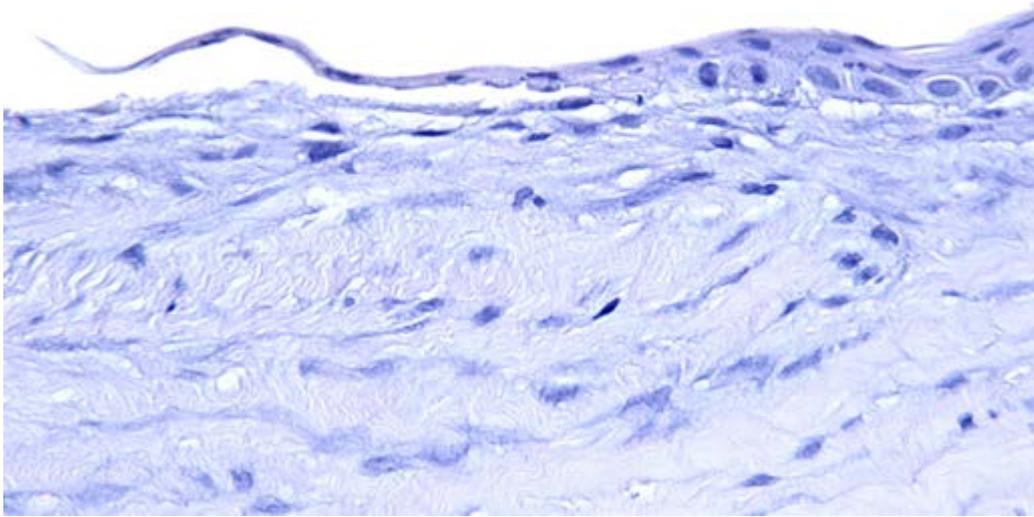
Структурное состояние роговицы глаза после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани характеризовалось равномерным покрытием всей поверхности роговицы эпителием, вместе с тем, выявлено четкое подразделение границы трепанационной зоны (Рис. 10). Количество слоев эпителия на 14 сутки составляло от 7 до 2 от периферии к центру, соответственно. В строме наблюдали признаки склероза волокнистых конструкций.



**Рис. 9.** Микроморфологическая характеристика роговицы глаза животного на 7-е сутки после введения ауто-МСКЖТ. Толуидиновый синий. Об.20. Ок.10.

У контрольных животных на 7-е сутки эпителизацию дефекта наблюдали лишь в 20 % случаев. Признаки регенерации эпителиального пласта выявлены лишь по периферии зоны повреждения. В строме присутствовали выраженный отёк и макрофагально-фибробластическая инфильтрация с увеличением количества активных фибробластов (Рис.11).

На 14-е сутки дефект уже эпителизирован у всех особей контрольной группы. Однако эпителиальный пласт истончен и представлен всего 2-3 слоями клеток. В строме отмечали признаки склероза. По краям дефекта сохранялась макрофагальная инфильтрация, при этом явление отёка было более ярко выражено, чем у животных всех опытных групп.



**Рис. 11.** Светооптическая характеристика роговицы глаза животного контрольной группы на 7-е сутки наблюдения.

Толуидиновый синий. Об.40. Ок.10.

Сравнительный анализ регенераторного влияния разных типов стволовых клеток показал, что эпителизация зоны дефекта роговицы у животных после введения жировых СК происходила активнее и в более короткие сроки в сравнении с животными, которым вводили аутологичные лимбальные стволовые клетки. (Таблица 1)

Лидером по скорости эпителизации дефекта и количественного представительства эпителиальных слоёв явились особи, которым вводили гомологичные стволовые клетки лимба. (Таблица 2)

На сегодняшний момент, наши исследования направлены на выяснение тонких механизмов регуляции процессов дифференцировки стволовых клеток, после трансплантации их на поверхность глаза. После подтверждения эффективности и безопасности нового метода лечения станет возможным его применение у пациентов с тяжелыми заболеваниями и повреждениями глаз, ранее неизбежно приводивших к значительному снижению зрения и слепоте.

При некоторых офтальмологических заболеваниях нет острой необходимости прибегать к клеточной терапии, однако после ожогов глаз или при рецидивирующей эрозии роговицы стандартное лечение зачастую не приводит к желаемым результатам. А позднее закрытие эпителиального

повреждения заканчивается необратимыми изменениями роговицы. Поэтому в данных случаях трансплантация стволовых клеток не только желательна, но и необходима, ведь их внедрение в организм приводит к снижению мутности роговицы, стимуляции процессов репаративного восстановления, затуханию отека и нормализации кровотока в конъюнктиве.

Положительный эффект от внедрения стволовых клеток дают такие содержащиеся в них элементы, как цитокины, интерлейкины и факторы роста, именно их наличие активизирует восстановительные процессы и поддерживает жизнедеятельность клеток в тканях. Проведение процедуры трансплантации стволовых клеток пациенту отличается чрезвычайной простотой, атравматичностью и не требует хирургического вмешательства.

Таблица 1

Сравнительная оценка скорости эпителизации роговицы от периферии к центру (мм)

<b>СРОКИ</b>	<b>ауто-ГСК</b>	<b>ауто-МСКЛТ</b>	<b>гомо-МСКЛТ</b>	<b>ауто-МСКЖТ</b>	<b>гомо-МСКЖТ</b>	<b>Контроль</b>
<b>3-5 суток</b>	3,9±0,7	4,5±0,9	5,3±1,1	5,1±1	4,1±0,8	3,5±0,7
<b>7 суток</b>	5,4±1,1	5,9±1,2	6,2±1,2	5,9±1,2	5,8±1,2	5,1±1
<b>14 суток</b>	6,5±1,3	6,5±1,3	6,5±1,3	6,5±1,3	6,5±1,3	6,5±1,3

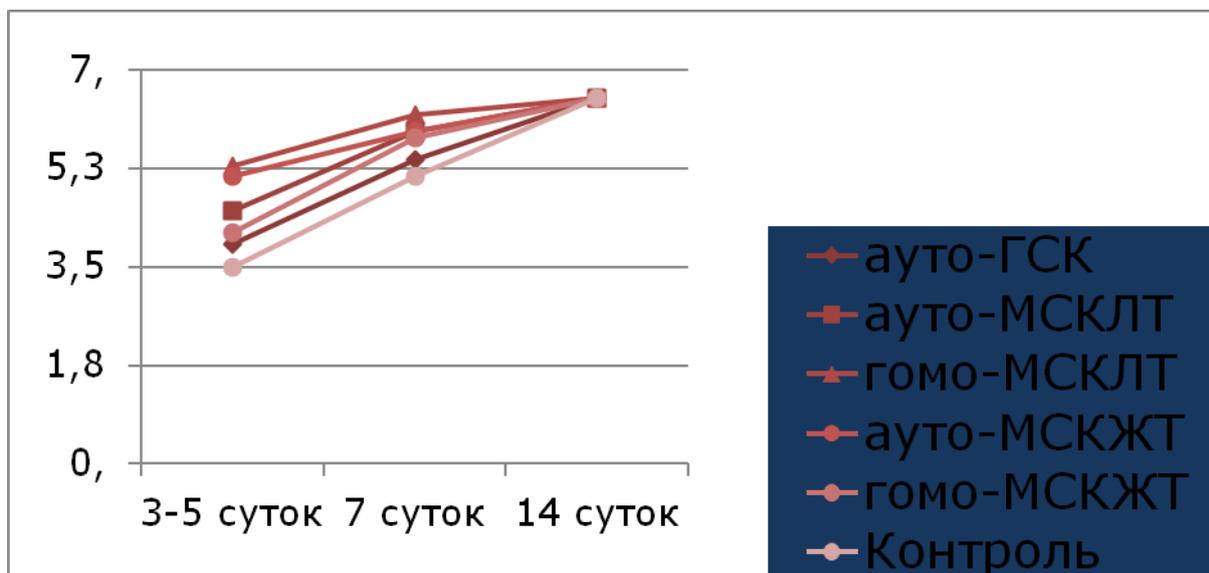
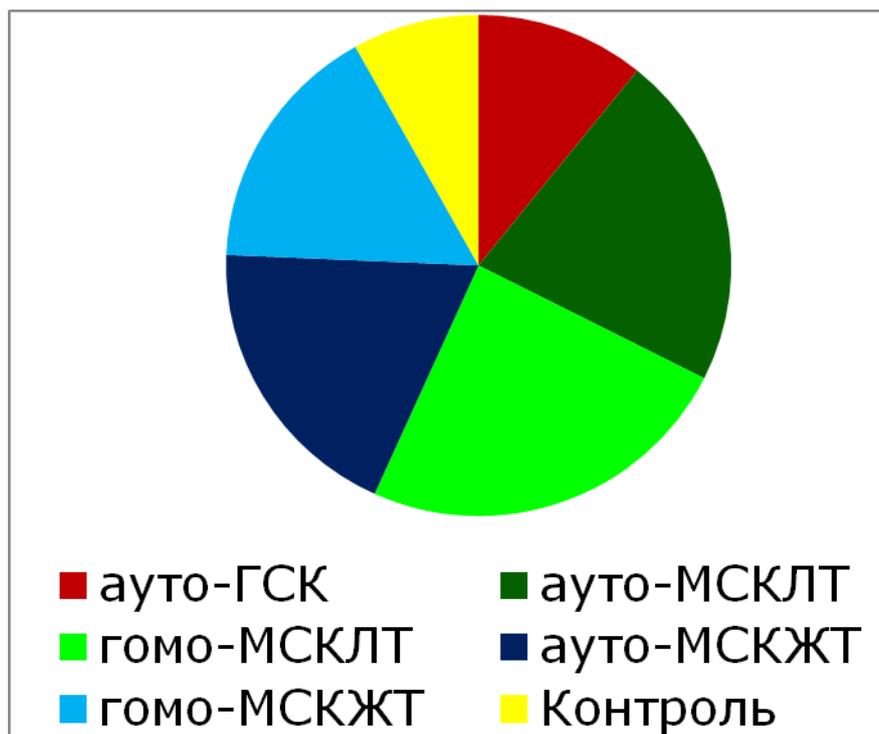


Таблица 2

Качественная сравнительная оценка результатов применения стволовых клеток различных типов в зависимости от количества слоев клеток поверхностного эпителия (срок 14 суток)

	Среднее количество слоев эпителия роговицы. Срок 14 суток.
<b>ауто-ГСК</b>	4±0,8
<b>ауто-МСКЛТ</b>	8±1,6
<b>гомо-МСКЛТ</b>	9±1,8
<b>ауто-МСКЖТ</b>	7±1,4
<b>гомо-МСКЖТ</b>	6±1,2
<b>Контроль</b>	3±0,2



Позже, была проведена адаптация радикального метода терапии аутологичными клетками лимба кошек с симблефароном, осложнённой лимбальной недостаточностью.

Материалы и методы. В эксперименте приняло участие одно животное, с унилатеральным симблефароном, сопровождающимся лимбальной недостаточностью.

Пациенту проводилось офтальмологическое обследование, которое включало: исследование зрительных функций, окрашивание роговой оболочки 0,2 % раствором флюоресцеина-натрия с последующей биомикроскопией. Исследования также включали постановку иммунологических реакций (ИФА, ПЦР), которые проводились в первые дни обострения герпетического кератита и перед оперативным лечением (в стадию ремиссии герпетического кератита). Во время рецидива ГК пациент получал консервативное лечение. В период ремиссии, через 40 дней после окончания консервативного лечения рецидива герпетической инфекции была произведена операция по трансплантации аутологичных клеток лимба.

После очищения роговицы от рубцовых тканей раненая поверхность конъюнктивы была обработана посредством аппликации препаратом митомycin-c, с целью уменьшения пролиферации фибробластов. Ход операции лимбальной иммобилизации: из здорового глаза методом ламеллярной кератэктомии было осуществлено взятие материала и полученный лимбальный биоптат (аутотрансплантат) был пересажен на подготовленное ложе в области лимба больного глаза. В месте фиксации трансплантата к роговице были наложены швы. В послеоперационный период больной получал противовирусное лечение препаратом (действующее вещество ацикловир) в лечебной дозе. Также были назначены местно глазные формы антибиотиков (для профилактики присоединения вторичной бактериальной инфекции).

После операции оценивались: чувствительность роговицы, стабильность слёзной плёнки, степень помутнения и неоваскуляризации роговицы, плотность поверхностных и базальных клеток поверхностного эпителия роговицы. Клинических проявлений герпетической инфекции и гнойно-септических осложнений не наблюдалось. Инъекция сосудов роговицы здорового глаза исчезла к третьим суткам, осложнений и клинических проявлений герпетической инфекции в донорском глазу не отмечено.

Неоваскуляризация роговой оболочки через месяц после ЛКП (КИ) уменьшилась, соответственно степень прозрачности роговицы увеличилась. Была отмечена оптимизация функциональных характеристик роговой оболочки, таких как чувствительность и стабильность слёзной плёнки.

## ВЫВОДЫ

1. Показана возможность использования разных типов стволовых клеток в ветеринарной офтальмологии для лечебной коррекции повреждений роговицы, что подтверждается ее клинико-морфологическими характеристиками у подопытных животных.

2. В экспериментальный период наблюдений у животных, подвергшихся регенеративной терапии стволовыми клетками, отсутствовала неоваскуляризация роговицы, воспалительная реакция на травму была менее выражена, чем в контроле, активно протекали пролиферативные процессы после нанесения травмы, что косвенно указывает на индукцию заживления повреждённых тканей стволовыми клетками.

3. Результаты гистологического исследования позволяют заключить, что скорость и качество заживления дефекта роговицы глаза у опытных животных превосходили таковые у контрольных, что может свидетельствовать о пролиферативных потенциях стволовых клеток.

4. Сравнительный анализ регенераторного влияния разных типов стволовых клеток показал, что эпителизация зоны дефекта роговицы у животных после введения жировых СК происходила активнее и в более короткие сроки в сравнении с животными, которым вводили аутологичные лимбальные стволовые клетки.

5. Лидером по скорости эпителизации дефекта и количественного представительства эпителиальных слоёв явились особи, которым вводили гомологичные стволовые клетки лимба.

6. Все перечисленные клинико-морфологические признаки – подтверждение того, что гомологичные лимбальные стволовые клетки могут выступать в качестве индуктора репаративной регенерации повреждённых тканей глаза.

7. Доклиническая апробация на трёх собаках породы метис с поверхностными повреждениями роговицы подтверждает эффективность применения стволовых клеток лимбальной и жировой ткани.

8. Трансплантация лимба при унилатеральном симблефароне у кошек снижает неоваскуляризацию и улучшает прозрачность роговицы. Подобная методика может быть показана у пациентов с синдромом лимбальной недостаточности, а также при оптико-реконструктивных операциях.

9. Полученные результаты эксперимента по применению стволовых клеток в ветеринарной офтальмологии являются базовыми для использования в практической ветеринарной медицине при регенеративной терапии повреждений роговицы глаза.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. П. Копенкин, Л. Ф. Сотникова *Болезни глаз мелких домашних животных* Издательство: КМК Серия: Учебники для вузов. Специальная литература  
ISBN 978-5-87317-434-8; 2008 г.
2. Morgan R, Abrams K. A comparison of six different therapies for persistent corneal erosions in dogs and cats. *Vet Comp Ophthalmol* 1994
3. Kirschner S. Persistent Corneal Ulcers: What to do when ulcers wont heal? *Vet Clin N Am* 1990
4. Gelatt K., Samuelson D. Recurrent corneal erosions and epithelial dystrophy in the Boxer dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982
5. Murphy CJ, Marfurt CF, McDermott A, et al. Spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs: Clinical features, innervation, and effect of topical SP, with or without IGF-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001
6. Matsubara M, Zieske JD, Fini ME. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1991; 32: 3221–3237.
7. Caplan A.I., Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Cell Biochem.* 2006; 98(5): 1076–84.
8. Hardy S.A., Maltman D.J., Przyborski S.A. Mesenchymal stem cells as mediators of neural differentiation. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2008; 3(1): 43–52.
9. Prockop D.J., Oh J.Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* 2012; 20(1): 14–20.
10. Salgado A.J., Reis R.L., Sousa N. et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2010; 5(2): 103–10.
11. Jorgensen C., Djouad F., Apparailly F. et al. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Ther.* 2003; 10: 928–31.

12. Salazar-Onfray F., Lopez M.N., Mendoza-Naranjo A. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18: 171–82.
13. Goodwin J., Bankhurst A., Messner R. Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin producing suppressor cell. *J. Exp. Med.* 1977; 146: 1719–34.
14. Minakuchi R., Wacholtz M., Davis L. et al. Delineation of the mechanism of inhibition of human T cell activation by PGE<sub>2</sub>. *J. Immunol.* 1990; 145: 2616–25.
15. Song Y.H., Pinkernell K., Alt E. Stem cell induced cardiac regeneration: fusion/mitochondrial exchange and/or transdifferentiation? *Cell Cycle.* 2011; 10(14): 2281–6.
16. Kemp K., Gordon D., Wraith D.C. et al. Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2011; 37(2): 166–78.
17. Spees J.L., Olson S.D., Ylostalo J. et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *PNAS USA* 2003; 100(5): 2397–402.
18. Goldberg MF, Bron AJ (1982). «Limbal palisades of Vogt». *Trans Am Ophthalmol Soc* 80: 155–71. PMID 7182957.
19. Thomas PB, Liu YH, Zhuang FF, Selvam S, Song SW, Smith RE, Trousdale MD, Yiu SC (2007). «Identification of Notch-1 expression in the limbal basal epithelium». *Mol. Vis.* 13: 337–44. PMID 17392684.
20. Дронов М.М.. О роговичных трансплантатах. *Офтальмохирургия и терапия.* 1/2002- том 2. СПб.-2.
21. Ченцова Е.В. Система патогенетически обоснованного лечения ожоговой травмы глаз. Дис. Е д–ра мед. наук. М. – 1996. – 304 с.
22. Войно–Ясенецкий В.В. Разрастание и изменчивость тканей глаза при его заболеваниях и травмах. – Киев, 1979. – 184с.

23. К.В. Котенко, И.И. Еремин, Б.Б. Мороз, А.Ю. Бушманов, Н.М. Надежина, И.А. Галстян, О.С. Гринаковская, А.В. Аксененко, Ю.Б. Дешевой, В.Г. Лебедев, Т.С. Слободина, Ю.А. Жгутов, С.Е. Лаук-Дубицкий, П.С. Еремин. Клеточные технологии в лечении радиационных ожогов: опыт ФМБЦ им.Бурназяна; КТТИ 2012 Май; VII(2) 97-10
24. Ричардсон Л. Смит Р. Стволовые клетки в ветеринарии - попытки стимуляции регенерации сухожилий у лошадей после травмы / Отдел ветеринарных клинических наук, Королевского колледжа ветеринарии, Лондонский университет, Хартфордшир AL9 7TA, Великобритания // материалы сайта PubMed. Com
25. материалы сайта PubMed.com
26. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. Регенеративная медицина: Направления, достижения, проблемы и перспективы развития. Часть II: Стволовые пространства // Украинский медицинский журнал. -2004; №3 (41) – V-VI. – С. 99-107.