

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ»

УДК 617.731-007.23

**БЕЛЯКОВСКИЙ  
Павел Васильевич**

**ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЛЕЧЕНИИ ТОКСИЧЕСКИХ И  
ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА И СЕТЧАТКИ**  
(экспериментально-клиническое исследование)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук  
по специальности 14.01.07 – глазные болезни

Минск, 2015

Работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный руководитель:

**Позняк Николай Иванович**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом офтальмологической помощи Филиала Открытого акционерного общества «Минский тракторный завод» «Медицинский центр-МТЗ»

Официальные оппоненты:

**Красильникова Виктория Леонидовна**

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры офтальмологии учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

**Ильина Светлана Николаевна**

кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой глазных болезней учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Оппонирующая организация:

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

Защита состоится « 28 » мая 2015 г. в 15.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.15.06 при государственном учреждении образования «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования» по адресу: 220013 , г. Минск, ул. П. Бровки, д. 3, корп. 3, тел. (017) 2004427, e-mail: [lorkafedra@tut.by](mailto:lorkafedra@tut.by).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения образования «Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования».

Автореферат разослан «23» апреля 2015 года.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций  
кандидат медицинских наук

В.Л. Чекан

## **ВВЕДЕНИЕ**

Заболевания зрительного нерва, сетчатки и сосудистой оболочки составляют 15 % от заболеваний зрительной системы, приводящих к инвалидности. Из них 11 % составляет первичная инвалидность у лиц трудоспособного возраста. Атрофия зрительного нерва (АЗН) и возрастная (сенильная) макулярная дегенерация (ВМД) являются одними из основных причин слабовидения. Так 98% инвалидов по зрению с АЗН нуждаются в социальной реабилитации [Либман Е. С., 2000]. Иницилирующими патогенетическими факторами развития АЗН являются: дисфункция каналов активного ионного транспорта, приводящая к нарушению хеомикроциркуляции в нервных волокнах зрительного нерва; тканевая гипоксия и энергетическая недостаточность, сопровождающаяся дисметаболической продукцией цитотоксических агентов и нейротрансмиттеров [Шаимова В. А., 2002; Гусев Е. И., 2001]; а так же формирующийся парабиоз, снижающий возбудимость нервной ткани и формирующий последующую атрофию аксонов ганглиозных клеток сетчатки [Трон Е. Ж., 1968; Гусев Е. И., 2001].

Стремление офтальмологов к поиску патогенетически обоснованного пути лечения токсико-дегенеративных поражений заднего отрезка глазного яблока человека, отражает необходимость проведения исследований с использованием стволовых клеток (СК) в лечении патологических состояний зрительного нерва и сетчатки. В качестве внутреннего резерва регенерации СК преобладают над всеми другими детерминированными пролиферирующими клетками [Репин В. С. и соавт., 2002; Сухих Г. Т., Малайцев В. В., 2001]. Мультипотентные СК являются мощным восстановительным клеточным резервом, способствуя замещению дефектов, возникающих при различных повреждающих воздействиях в организме [Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А., 1980; Лосева Е. В., 2001; C. Hofstetter et al., 2002; Степанов Г. А. и соавт., 2003].

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Связь работы с научными программами (проектами), темами**

Диссертационная работа соответствует приоритетному направлению фундаментальных и прикладных научных исследований – охране здоровья населения Республики Беларусь, а также пункту 4 «Разработка новых лечебных, диагностических, профилактических и реабилитационных технологий,....», перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006-2010 годы,

утвержденной Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 17.05.2005г. №512.

Диссертационное исследование выполнено по плану научных исследований учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» в рамках государственной научно-технической программы кафедры глазных болезней БГМУ: «Медицинская реабилитация при витреоптикоретинальных заболеваниях и патологии придаточного аппарата глаза у взрослых и детей», зарегистрированной в ЦГР НИОКР БелИСА (номер госрегистрации: 20110626, срок выполнения 2010г.-2016г.).

### **Цель и задачи исследования**

**Цель исследования** – разработать и внедрить в клиническую практику экспериментально обоснованную методику применения клеточных технологий для лечения пациентов с токсико-дегенеративными поражениями зрительного нерва и сетчатки, основанную на аутологичной трансплантации сегмента лимба роговицы (АТСЛР) и трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

### **Задачи исследования**

1. В эксперименте на лабораторных животных (кролики) оценить динамику морфо-функциональных изменений ганглионарных волокон сетчатки и зрительного нерва под влиянием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) на модели каинатной оптиконеуропатии (КОНП).
2. Разработать оптимальный метод трансплантации эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) на лабораторных животных (кролики).
3. Исследовать динамику объективных изменений офтальмологического статуса после аутологичной трансплантации сегмента лимба роговицы пациентов, с дегенеративными заболеваниями сетчатки и зрительного нерва.
4. Разработать технологию лечения дегенеративной патологии сетчатки и зрительного нерва методом трансплантации аутологичных МСК.

### **Научная новизна**

1. Получены морфологические данные, доказывающие, что проведенная ретробульбарная трансплантация эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) кроликам при каинатной оптиконеуропатии (КОНП) снижает повреждение ганглионарных нервных волокон сетчатки и зрительного нерва.
2. Проведенные экспериментальные исследования доказали, что оптимальным методом трансплантации является введение ЭСК в ретробульбарное пространство глаза кролика в количестве 500000 клеток, для

воздействия на токсическую оптиконеуропатию (ТОНП) экспериментальных животных (кролики).

3. Разработан новый способ хирургического лечения пациентов с дегенеративными поражениями зрительного нерва и сетчатки методом аутотрансплантации сегмента лимба роговицы (патент №14927, 23.06.2011, Республика Беларусь).

4. Разработан комбинированный метод трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (инструкция по применению № 261-1213, 17.10.2014, МЗ Республики Беларусь) у пациентов с дегенеративной патологией сетчатки и зрительного нерва.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Ретробульбарная трансплантация эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) кроликам при каинатной оптиконеуропатии (КОНП) уменьшает повреждение ганглионарных нервных волокон сетчатки, что выражается в сохранении толщины слоя аксонов ганглионарных клеток сетчатки каудальных отделов ДЗН до  $150,5 \pm 14,0 \mu\text{m}$ , на 150-е сутки наблюдения, по сравнению с контрольной группой КОНП, в которой наблюдается практически полный распад аксонального слоя ганглионарных клеток сетчатки до  $9,4 \pm 5,5 \mu\text{m}$ .

2. Разработан метод трансплантации ЭСК в ретробульбарное пространство глаза кролика, стабилизирующий процесс развития токсической оптиконеуропатии (ТОНП), что позволило обосновать преимущество и целесообразность применения методов лечения токсико-дегенеративного поражения нервных волокон сетчатки и зрительного нерва в практической медицине с использованием трансплантации аутологичных клеточных культур.

3. Предложенный способ аутотрансплантации сегмента лимба роговицы (АТСЛР) в супрахориоидальное пространство у пациентов с токсико-дегенеративным поражением зрительного нерва и сетчатки (патент №14927, 23.06.2011, Республика Беларусь) позволяет повысить остроту зрения в 80,7 % случаев и расширить поле зрения в 72,6 % случаев.

4. Комбинированный метод трансплантации аутологичных МСК (инструкция по применению № 261-1213, 17.10.2014, МЗ Республики Беларусь) в супрахориоидальное пространство и ткань теноновой оболочки, в дозе 3-5 млн. клеток, а также внутривенное введение мезенхимальных стволовых клеток (МСК), в дозе 1 млн. клеток /кг м.т., сопровождается повышением остроты зрения в 1,84 раза и расширением поля зрения в 50% случаев.

### **Личный вклад соискателя ученой степени**

Работа выполнялась на кафедре глазных болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет». Автором лично проведен

патентно-информационный поиск по теме диссертации, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы по проблеме токсико-дегенеративного поражения зрительного нерва и сетчатки (личный вклад – 100%). В соавторстве с научным руководителем сформулированы цель и задачи исследования, разработан и запатентован новый способ оперативного лечения пациентов с дегенеративным поражением зрительного нерва и сетчатки (патент №14927, 23.06.2011, Республика Беларусь), инструкция на метод (инструкция по применению № 261-1213, 17.10.2014, МЗ Республики Беларусь) (личный вклад – 90 %). Соискателем самостоятельно выполнен сбор и анализ первичных материалов, положенных в основу настоящего исследования (личный вклад – 100%). Интерпретация полученных данных, выдвинутые на защиту положения и научная новизна, заключение, содержащее выводы и практические рекомендации, являются результатом самостоятельных исследований автора. Соискатель непосредственно выполнял операции на экспериментальных животных, осуществлял наблюдение за ними, производил забор материала совместно с сотрудниками вивария ЦНИЛ БГМУ; морфологические исследования, описание результатов и их интерпретация проводилась совместно с профессором, доктором медицинских наук Леонтьюком Анатолием Сергеевичем (УО БГМУ) и заведующим Центральной судебно-гистологической лабораторией ГКСЭ Республики Беларусь Рябковой Ириной Леонидовной (личный вклад – 70%). Диссертант непосредственно проводил сбор сведений о больных с дегенеративными изменениями сетчатки и зрительного нерва, их систематизацию и анализ, клиническое обследование пациентов, количественную и качественную оценку результатов исследования. Диагностические обследования и операции выполнял самостоятельно в операционной Филиала Открытого акционерного общества «Минский тракторный завод» «Медицинский центр МТЗ» (личный вклад – 100%).

Все основные научные результаты диссертации получены автором лично и отражены в научных статьях, материалах конференций [1, 3-14], а также в тезисах докладов [15- 21] – личный вклад – 90%.

Результаты исследования внедрены в лечебный процесс офтальмологических отделений Филиала Открытого акционерного общества «Минский тракторный завод» «Медицинский центр МТЗ», УЗ «ЗГКБ» г. Минска. Личный вклад во внедрение – 90%.

Автором самостоятельно выполнены статистическая обработка и анализ полученных данных, написание разделов диссертации – вклад 100%.

Автор выражает признательность и благодарность заведующему кафедрой глазных болезней БГМУ, д. м. н., профессору Л.Н. Марченко, заведующему кафедрой нервных и нейрохирургических болезней БГМУ, д. м. н., профессору А.С. Федулову за научные консультации и методическую

помощь. Ученому-биофизику, академику, член-корр., д.б.н., профессору, заслуженному деятелю науки Республики Беларусь, директору института биофизики и клеточной инженерии НАН И.Д. Волотовскому, его сотрудникам, и в частности к.б.н. Е.С. Лобанок за предоставленные материалы для экспериментальной части НИР, консультативную помощь. Директору Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Республики Беларусь, член-корр. НАН, д.м.н., профессору О.В. Алейниковой, заведующей лабораторией клеточных биотехнологий и цитотерапии, к.б.н. Я.И. Исайкиной, сотрудникам центра за предоставленные материалы для практической части НИР и консультативную помощь. Заведующей вивария УО БГМУ Ж.А. Макаревич, к.в.н. Л.В. Бутько, сотрудникам вивария и ЦНИЛ Белорусского государственного медицинского университета г. Минска за содействие и помощь.

### **Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов**

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены: на международной научно-практической конференции «Стволовые клетки и современные технологии в трансплантологии», БелМАПО, г. Минск, 2007г.; 7-м республиканском съезде офтальмологов РБ, БелМАПО, г. Минск 2007г.; 3-й Всероссийской научной конференции молодых ученых с участием иностранных специалистов «Актуальные проблемы офтальмологии» – ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова Росмедтехнологии», г. Москва, 2008 г.; Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы трансплантологии», Национальная академия наук Республики Беларусь и МЗРБ, г. Минск 2008г.; Республиканской конференции, посвященной 100-летию со дня рождения В.А. Бандарина «Достижения современной биологии, химии и медицины», г. Минск, 2009 г.; Республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы витреоретинальной патологии», Бел МАПО, г. Минск, 2009 г.; Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы диагностики и лечения эндокринной офтальмопатологии», г. Гомель, 2010г.; на 8-м съезде офтальмологов республики, БелМАПО, Республика Беларусь, г. Минск, 2011г.; научно-практической конференции с международным участием «Новые технологии в лечении заболеваний роговицы», г. Минск, Республика Беларусь, 2011 г.; на Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы детской офтальмологии», г. Гомель, Республика Беларусь, 2012 г.; на Республиканской конференции с международным участием «Трудности диагностики, ошибки и осложнения в

офтальмологии», БелМАПО, г. Минск, 2012 г.; научно-практической международной офтальмологической конференции НОК 2012 (Финляндия, Хельсинки); на Республиканской конференции с международным участием «Современная реконструктивная хирургия в офтальмологии», г. Минск, Республика Беларусь, 2013 г..

Результаты исследования внедрены в лечебный процесс офтальмологических отделений Филиала Открытого акционерного общества «Минский тракторный завод» «Медицинский центр МТЗ», УЗ «ЗГКБ» г. Минска и У «Гомельская областная специализированная клиническая больница» г. Гомеля (7 актов внедрения).

### **Опубликование результатов диссертации**

По теме диссертации опубликовано 21 научная работа: 7 статей в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК и соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий Республики Беларусь (объемом 2,68 авторских листа); 14 статей и тезисов докладов в материалах научных конгрессов, съездов и конференций (без соавторов опубликовано 4 научных работы). Совместно с соавторами разработана и утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 1 инструкция по применению «Комбинированный метод лечения дегенеративной патологии заднего отрезка глазного яблока с использованием трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток», регистрационный № 261-1213, от 17.10.2014 г., получен патент Национального центра интеллектуальной собственности Республики Беларусь № 14927 от 30.10.2011г. «Способ хирургического лечения дистрофических заболеваний сетчатки и зрительного нерва».

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из перечня сокращений, введения, общей характеристики работы, обзора литературы, 3-х глав собственных исследований, заключения, библиографического списка и приложений. Объем диссертации составляет 181 страницу компьютерного текста. Основная часть работы занимает 144 страницы, содержит 51 иллюстрацию (19 страниц) и 13 таблиц (5 страниц). Раздел «Библиографический список» включает два подраздела: «Список использованных источников», содержащий 301 работу (132 – на русском и 169 – на иностранном языке) и «Список публикаций соискателя», в котором приводится 21 работа соискателя по теме диссертации (28 страниц). Приложения включают 7 актов о внедрении, 1 авторское свидетельство и 1 инструкцию по применению.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Материал и методы исследования

**Экспериментальные исследования** проводились в ЦНИЛ БГМУ согласно утвержденным протоколам на лабораторных животных (кролики, n=50). Модель токсической оптиконеуропатии создавали интравитреальным введением каиновой кислоты в дозе 0,04 мг (Sigma, USA). Материалом для исследования послужили эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), ES R1 - потомка скрещивания 129\Sv x 129\Sv-CP (формировались плюрипотентные колонии, определялась положительная окраска на эндогенную щелочную фосфатазу). Для сравнительного анализа использовали человеческий рекомбинантный фактор LIF (Leukemia Inhibitory Factor, Sigma, USA), экспрессированный в E.coli и фактор роста SCF (Stem Cell Factor, Technologies Inc., Канада).

Кролики были распределены на пять групп: в 1-ой группе (n=10) вводили каиновую кислоту в дозе 0,04 мг интравитреально (формирование каинатной оптиконеуропатии (КОНП)); во 2-ой группе (n =10) вводили ретробульбарно LIF 0,3 мл; в 3-ей группе (n=10) ретробульбарно вводили SCF 0,3 мл; в 4-ой группе (n=10) ретробульбарно вводили ЭСК  $0,5 \cdot 10^6$  кл/мл в 0,5 мл физиологического раствора (Phosphate Buffered Saline, PBS); 5-я группа (n=10) контрольная, с ретробульбарным введением PBS. Введение эффекторов во 2-ой – 5-ой группах производилось на 5-ые сутки, после интравитреального введения каиновой кислоты в дозе 0,04 мг (формирование каинатной оптиконеуропатии (КОНП)).

**В ходе операции** проводили последовательно разрез конъюнктивы и теноновой капсулы в 3-6 мм от лимба в проекции внутренней прямой мышцы. Шпателем увеличивали субтеноновое пространство на длину пластиковой канюли, эффекторы (ЭСК, LIF, SCF, р-р PBS в группе контроля) вводились к заднему полюсу глазного яблока. Пластиковая канюля удалялась, одновременно затягивался кисетный конъюнктивальный шов 8:0. Накладывалась асептическая повязка.

Наблюдение в группах проводилось до формирования полной атрофии диска зрительного нерва (ДЗН). Анализ влияния эффекторов на нейральные волокна ДЗН и сетчатки кроликов осуществляли при исследовании на анализаторе заднего отрезка глазного яблока "Retcam"(USA). Критериями оценки результативности используемых эффекторов являлось: - начало распада аксонов ганглионарных клеток; - полный распад «веерообразных волокон» ДЗН; - распад каудальных отделов ДЗН; - атрофия ДЗН. Осмотры

производились на 2, 3, 5, 7, 15, 25, 30 сутки, затем через каждые 15 дней до 3-х месяцев, затем через 30 дней до  $540,0 \pm 12,9$  суток.

По истечению срока наблюдения животных выводили из опыта путем тиопенталового наркоза, производили энуклеацию, гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, а так же по Ван–Гизону.

### **Общая характеристика клинического материала**

В клиническую часть исследования включены 43 пациента (54 глаза) с дегенеративными изменениями заднего отрезка глазного яблока (центральная дистрофия, пигментная дистрофия сетчатки и атрофия зрительного нерва (АЗН)). Средний возраст пациентов составлял  $63,67 \pm 19,6$  года.

В зависимости от способа лечения дегенеративной патологии сетчатки и ЗН, пациенты были распределены на три репрезентативные группы.

**Первую группу составили** 20 человек (25 глаз), 8 мужчин и 12 женщин (40% и 60% соответственно), средний возраст пациентов составил  $62,35 \pm 22,2$  года, оперированных по разработанной автором методике аутотрансплантации сегмента лимба роговицы (АТСЛР) патент Республики Беларусь №14927 [22].

#### **Ход операции:**

Обработка, анестезия и операционный доступ проводится стандартным путем. Выделенный участок лимбальной ткани 3 мм в длину, 1 мм в ширину, перемещается к заднему отделу глазного яблока, совместно с субконъюнктивной и полоской отсепарованной теноновой оболочки и погружается в супрахориоидальное пространство с фиксацией к склере швами 8.0. Конъюнктура адаптируется швами 8.0. Асептическая повязка.

**Контрольную группу составили** 19 пациентов (25 глаз), 7 мужчин и 12 женщин (36,8% и 63,2% соответственно), средний возраст пациентов составляет  $67,63 \pm 17,32$  лет, проходивших курсы сосудорасширяющей и дедистрофической терапии в этой же базовой клинике.

**Вторую основную группу** составили 4 пациента (8 глаз), мужчины, оперированных по разработанной автором методике комбинированной трансплантации аутологичных МСК (инструкция МЗ Республики Беларусь [23]). Средний возраст пациентов составляет  $51,5 \pm 12,7$  лет.

**Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток:** для получения аутотрансплантата МСК взята технология, описанная Кос. Принадлежность полученных таким методом клеток к МСК подтверждается наличием поверхностных маркеров CD105, CD90, CD44, характерных для МСК и отсутствием маркеров гемопоэтических клеток CD34, CD45, CD14. Производят несколько пассажей (не менее 3-х), при которых МСК наращивают *in vitro* до нужного объема в зависимости от массы тела пациента. Перед трансплантацией пациенту, клетки, наращенные *in vitro*, идентифицируют на

проточном цитофлуориметре на наличие поверхностных маркеров, характерных для МСК. Обязательным требованием является исследование МСК из каждого пассажира на стерильность по всему спектру возможной бактериальной и вирусной контаминации.

**Лазерная стимуляция области fovea:** предварительно за два часа до внутривенного введения аутологичных МСК производят фотостимуляцию области fovea трехспектральным ретинальным фотостимулятором (патент на изобретение Республики Беларусь №6259, зарегистрирован в Госреестре изобретений 2004.02.13, приоритет 2001.02.28).

**Внутривенное введение аутологичных МСК:** суспензию МСК в 20 мл 0,9%-го раствора NaCl вводят пациенту инфузодомом (1,0 x 10<sup>6</sup>/кг веса) внутривенно в течение 15 минут.

**Трансплантация клеточного материала в супрахориоидальное пространство и ткань теноновой оболочки:** обработка, анестезия и операционный доступ проводится стандартным путем. В 12-14 мм от лимба, у основания сформированного П-образного склерального лоскута, через сквозной разрез склеры, при завязывании концов нити погружают участок теноновой оболочки с магистральным сосудом в супрахориоидальное пространство. Затем в сосудистый лоскут теноновой оболочки трансплантируют стволовые клетки, часть трансплантационного материала МСК вводят через канюлю в супрахориоидальное пространство. Склеральный клапан, конъюнктиву адаптируют узловыми швами 8/0. Накладывают асептическую повязку.

#### **Оценка функционального состояния глаз до и после операции**

Пациентам выполнены исследования на следующем медицинском оборудовании: визометрия на проекторе знаков CP – 30 SHIN NIPPON (Japan), авторефрактометрия на приборе RC – 4000 (TOMEY, Japan). Ультразвуковая биометрия глаза выполнялась на приборе В-scanner AL-3000, AL-4000, UD – 8000 (TOMEY, Japan); пневмотонометрия на аппарате REICHERT (USA), тонометр Маклакова; осмотр глазного дна с фундус-линзой Ocular (USA), сканирующий лазерный офтальмоскоп (Rodentstock, Germany); для оценки структурного состояния сетчатки проводилась оптическая когерентная томография на аппарате SOCT Copernicus HR OPTOPOL (Poland).

**Статистический анализ** полученных данных проводился с использованием программ Statistica (версия 6-Index, StatSoft Inc., США, лицензия №AXXR012E829129FA), MICROSOFT EXCEL 2007, программ SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Анализ соответствия вида распределения признаков закону нормального распределения выполнен с использованием критерия Шапиро—Уилка. В зависимости от соответствия/несоответствия вида распределения анализируемых признаков закону нормального распределения в расчетах использованы

непараметрические (тест Вилкоксона, Манна-Уитни) методы. Меры центральной тенденции и рассеяния данных рассчитывали при помощи методов описательной статистики; количественные параметры в зависимости от вида распределения представлены в виде среднего значения (M) и среднего квадратического отклонения (s) либо в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ( $Q_{25\%}; Q_{75\%}$ ). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят  $p < 0,05$ .

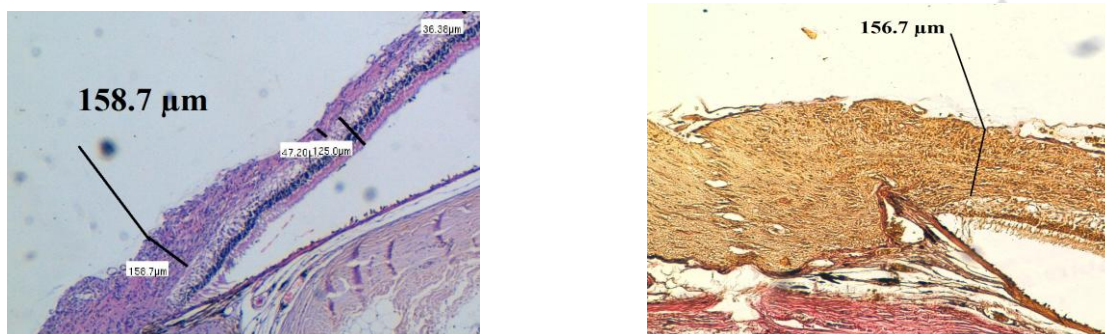
## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В экспериментальной части оценивалось воздействие эффекторов (ЭСК, LIF, SFC) на формирующуюся атрофию волокон диска зрительного нерва кролика, путем исследования ширины и длины каудальных отделов ДЗН кролика на аппарате «RetCam». На 150-е сутки отмечалось сокращение длины (Kruskal - Wallis test:  $\chi^2(2) = 23,410$ ,  $p \approx 0$  (извлечено 0000 выборок)) и ширины нервных волокон (Kruskal - Wallis test:  $\chi^2(2) = 23,955$ ,  $p = 5 \times 10^{-10}$ ) каудальных отделов ДЗН во всех 5-ти группах кроликов. При сравнении в группах с введением эффекторов (ЭСК, LIF, SFC) на 150-е сутки, установлено, что наибольшая стабилизация атрофии ганглионарных волокон каудальных отделов ДЗН наблюдалась в 4-ой группе (с введением ЭСК), как в случае сравнения длины (в 4-ой -  $7,25 \pm 0,59 \times 10^3 \mu\text{m}$ , во 2 -ой -  $1,78 \pm 0,47 \times 10^3 \mu\text{m}$ , в 3-ей группе -  $0,95 \pm 0,48 \times 10^3 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ...  $p = 0,0001$ ...,  $U=0$ : Mann - Whitney U-test), так и ширины пучков ганглионарных волокон (в 4-ой -  $1,13 \pm 0,12 \times 10^3 \mu\text{m}$ , во 2 -ой -  $0,46 \pm 0,06 \times 10^3 \mu\text{m}$ , в 3-ей группе -  $0,36 \pm 0,05 \times 10^3 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ...  $p = 0,0001$ ...,  $U=0$ : Mann - Whitney U-test). В группе контроля с КОНП на 150-е сутки отмечался полный распад каудальных пучков ганглионарных волокон. На  $450,5 \pm 12,1$  сутки наблюдения в 4-ой группе длина и ширина нервных волокон каудальных отделов ДЗН уменьшилась ( $z = 2,66$  ...  $2,80$ ,  $p = 0,007$  ...  $p = 0,005$ ...,  $p < 0,05$ , Wilcoxon test). Однако, длина нервных волокон была более статистически значимой, чем во 2-ой и 3-ей группах на 150-е сутки наблюдения ( $p < 0,05$ ,  $U=0$ ,  $p = 0,0001$ ...: Mann - Whitney U-test). Ширина каудальных отделов ДЗН в 4-ой группе, на  $450,5 \pm 12,1$  сутки наблюдения, была более статистически значимой, чем в 3-ей группе ( $p < 0,05$ ,  $U=11$ ,  $p = 0,03$ ...: Mann - Whitney U-test). При сравнении со 2-ой группой статистической значимости выявлено не было ( $U=38,5$ ,  $p = 0,385$ : Mann - Whitney U-test).

### Результаты морфологических исследований

При сравнительной оценке гистологических изменений на 150-е сутки наблюдения, толщина слоя аксонов ганглиозных клеток сетчатки каудальных отделов ДЗН в 4-ой группе (с трансплантацией ЭСК) была достоверно выше

( $150,5 \pm 14,0 \mu\text{m}$ ), по сравнению с 1-ой группой (КОНП), в которой наблюдался практически полный распад аксонального слоя ганглионарных клеток сетчатки ( $9,4 \pm 5,5 \mu\text{m}$ ) (рисунок 1).

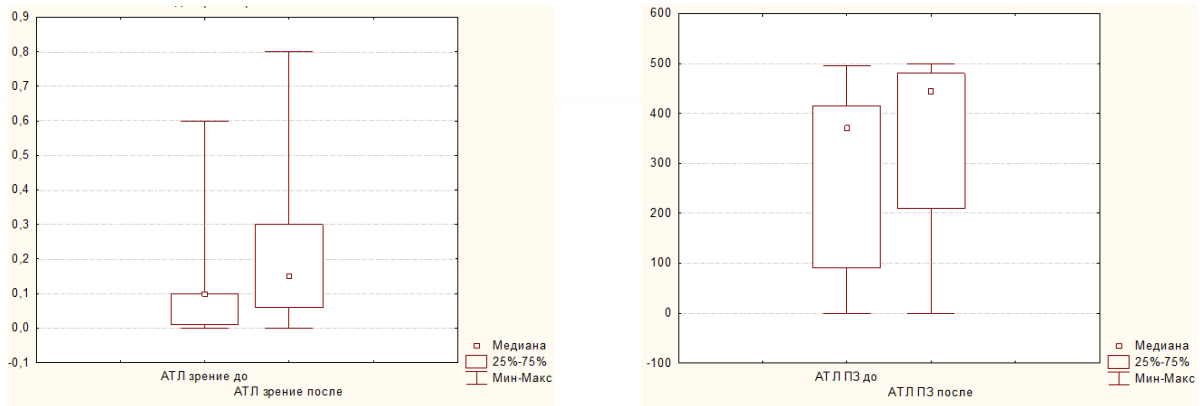


**Сохранившийся слой аксонов ганглиозных клеток сетчатки у диска зрительного нерва  $158,9 \pm 15,4 \mu\text{m}$ . Окраска (слева - направо) гематоксилином и эозином, увеличение  $4 \times 10$ ; по Ван-Гизону (наблюдается окрашивание нейральных клеток в коричневый цвет благодаря импрегнации азотнокислого серебра), увеличение  $10 \times 0,25$**   
**Рисунок 1. – Гистологический срез заднего отрезка глаза кролика с трансплантированными ЭСК (150 сутки наблюдения)**

Толщина слоя аксонов ганглионарных клеток сетчатки у ДЗН интактного глаза кролика была в пределах  $165,4 \pm 24,5 \mu\text{m}$ . Формирующаяся экскавация ДЗН вследствие атрофии ганглионарных клеток была более выраженной в 1-ой группе (КОНП) (остаточная толщина аксонального слоя ганглиозных клеток составляла  $88,3 \pm 19,1 \mu\text{m}$ ), в группе с трансплантацией ЭСК экскавация была меньше ( $558,8 \pm 110,8 \mu\text{m}$ ). Толщина слоя аксонов в головке ДЗН интактного глаза кролика составляла  $961,4 \pm 28,2 \mu\text{m}$ .

### **Анализ результатов клинических исследований**

**Анализ результатов первой группы с аутологичной трансплантацией сегмента лимба роговицы (АТСЛР) (n=25).** На основании W- критерия показана принадлежность групп с АТСЛР и контрольной к выборке нормальной генеральной совокупности (для остроты зрения (ОЗ)  $p \geq 0,05$ ,  $W = 0,79773$ ,  $p = 0,0000$ , для ПЗ  $p \geq 0,05$ ,  $W = 0,84961$ ,  $p = 0,00002$ : Shapiro–Wilk test). В послеоперационном периоде, через 6 месяцев, в группе с АТСЛР острота зрения увеличилась в 80,7 % (ОЗ до операции - 0,1293, ОЗ после операции – 0,236;  $p < 0,05$  ...  $p = 8,9 \times 10^{-5}$ ,  $Z = 3,92$ : Wilcoxon test), поле зрения (ПЗ) расширилось в 72,6 % случаев (ПЗ до операции 278,6 гр., после операции через 6 месяцев 343,4 гр.;  $p < 0,05$  ...  $p = 1,96 \times 10^{-5}$ ,  $Z = 3,72$ : Wilcoxon test) (рисунок 2).

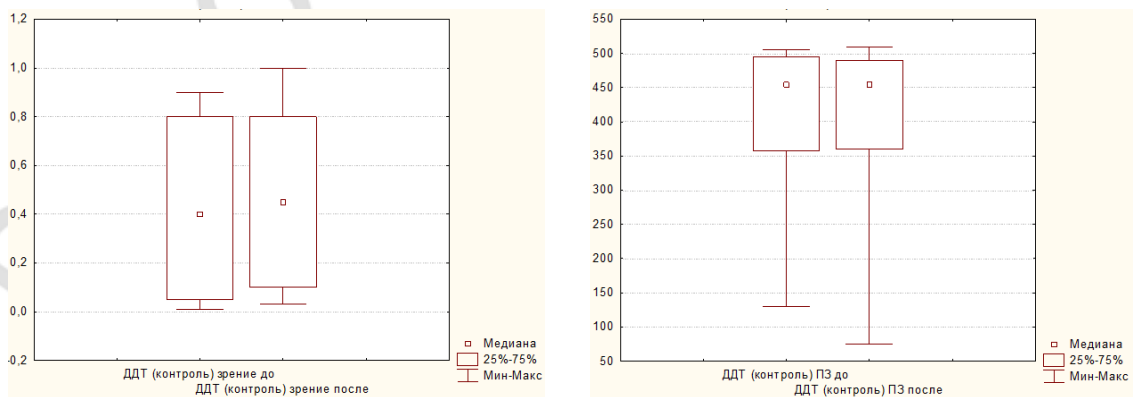


**Рисунок 2. – Динамика остроты и поля зрения до и после операции у пациентов основной группы АТСЛР**

При анализе изменений сетчатки на спектральном оптическом когерентном томографе SOCT Copernicus HR, Optopol (Poland) через 6 месяцев в 1-ой группе с аутотрансплантацией сегментов лимба роговицы (АТСЛР) наблюдалось статистически достоверное увеличение суммарной толщины слоев сетчатки. В фовеолярной зоне (central field thickness, у края ямки fovea), толщина сетчатки увеличилась на  $15,4 \pm 20,1 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05 \dots p = 0,005$ ,  $Z = 2,80$ : Wilcoxon test), в зоне average thickness (в 1 мм от fovea), толщина сетчатки увеличилась на  $23,6 \pm 12,5 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05 \dots p = 0,005$ ,  $Z = 2,80$ : Wilcoxon test).

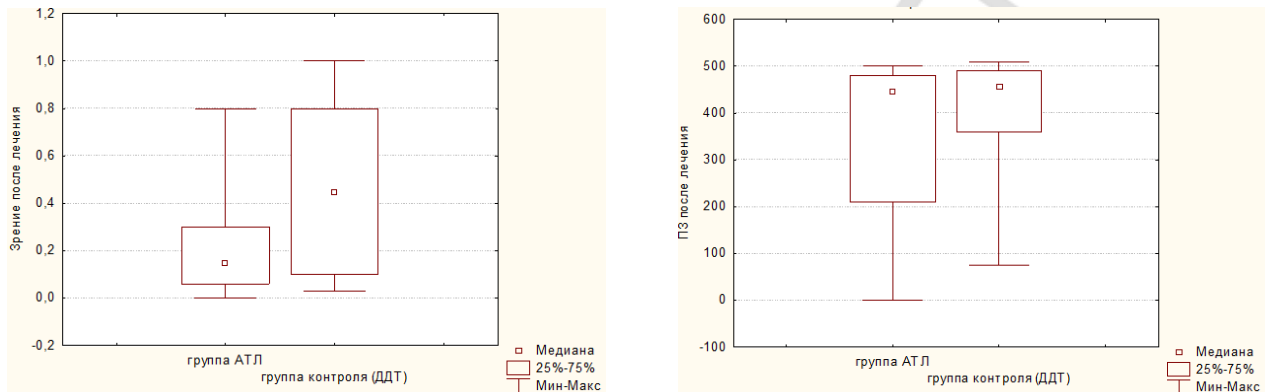
#### **Анализ результатов контрольной группы**

При анализе динамики зрительных функций отмечалось увеличение остроты зрения в 72,3 % случаев (ОЗ до - 0,4088, после через 6 месяцев - 0,4652;  $p < 0,05 \dots p = 0,000967$ ,  $Z = 3,299$ : Wilcoxon test), поле зрения после лечения расширилось в 28,3 % случаев, но достоверной статистической значимости не имело (до лечения ПЗ - 402,24 гр., после лечения через 6 месяцев - 402,96 гр.;  $p > 0,05 \dots p = 0,660346$ ,  $Z = 0,43$ : Wilcoxon test) (рисунок 3).



**Рисунок 3. – Динамика остроты и поля зрения до и после лечения у пациентов группы контроля**

**Сравнительный анализ результатов 1-ой основной и контрольной группы.** При сравнении в 1-ой и контрольной группах острота зрения (ОЗ) у пациентов основной группы преобладала ( $p < 0,05$  ...  $p = 0,02$ ,  $U = 193,5$ : Mann - Whitney U-test), статистически достоверных различий показателей поля зрения (ПЗ) в группах сравнения не выявлено ( $p > 0,05$  ...  $p = 0,271$ ,  $U = 255,5$ : Mann - Whitney U-test), однако в процентном соотношении ПЗ в 1-ой группе расширилось в 72,6 % случаев, в группе контроля ПЗ расширилось в 28% случаев (рисунок 4).



**Рисунок 4. – Сравнение остроты и поля зрения после проведенного лечения в основной и контрольной группах**

**Анализ результатов группы после комбинированной аутотрансплантации МСК.** После проведенной комбинированной аутотрансплантации МСК через 6 месяцев острота зрения (ОЗ) увеличилась в 1,84 раза (ОЗ до операции - 0,117, после операции - 0,22;  $p < 0,05$  ...  $p = 0,01$ ...,  $Z = 2,52$ : Wilcoxon test), суммарное поле зрения расширилось на 63,7 гр. (до операции - 423,12 гр., после - 486,87 гр.;  $p < 0,05$  ...  $p = 0,01$ ,  $Z = 2,52$ : Wilcoxon test).

**Экономическая эффективность использования способа аутологичной трансплантации сегмента лимба роговицы (АТСЛР) в лечении дегенеративных заболеваний сетчатки и зрительного нерва.** Для расчета экономического эффекта (ЭЭ) взяты официальные сведения из государственных статистических отчетов по заболеваниям, связанным с дистрофическим поражением зрительного нерва (в целом по учреждениям здравоохранения УЗ г. Минска). В качестве сравнения была предложена традиционная операция ревазуляризирующего типа, проводимая в стационарах, где мог быть внедрен разработанный способ АТСЛР. Экономический эффект (ЭЭ) внедрения способа АТСЛР (по сравнению с традиционной операцией ревазуляризирующего типа) = 121194925 рублей. Общий удельный экономический эффект (ОУЭЭ) при внедрении указанного

способа АТСЛР = 4847797 рублей. Предполагаемый среднегодовой экономический эффект от внедрения способа АТСЛР на контингентах пациентов с дегенеративным заболеванием зрительного нерва в г. Минске = 1368965880 рублей. Коэффициент экономической эффективности (КЭЭти) способа АТСЛР по отношению к операции ревааскуляризирующего типа - 6,88.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Трансплантация эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) в ретробульбарное пространство глаза кролика уменьшает повреждение ганглионарных нервных волокон сетчатки при формировании токсической оптиконейропатии (ТОНП), что отражается в сохранении толщины слоя аксонов ганглионарных клеток в диске зрительного нерва (в группе с трансплантацией ЭСК толщина аксонального слоя составила  $558,8 \pm 110,8 \mu\text{m}$ , в контрольной группе  $88,3 \pm 19,1 \mu\text{m}$ ; толщина слоя аксонов в головке ДЗН интактного глаза кролика составляла  $961,4 \pm 28,2 \mu\text{m}$ ). В процессе динамического наблюдения за моделью экспериментального токсико-дегенеративного процесса на лабораторных животных доказано преимущество ретробульбарной трансплантации ЭСК в процессе предотвращения развития ТОНП в сравнении с другими эффекторами (LIF и SCF). Так, формирование полной атрофии диска зрительного нерва (ДЗН) в группе с трансплантацией ЭСК отмечалось на  $540,0 \pm 12,9$  сутки, при введении эффекторов LIF и SCF на  $275,0 \pm 5,2$  и  $274,0 \pm 5,1$  сутки соответственно, в группе контроля с КОМП на  $157,5 \pm 2,6$  сутки [1- 5, 8-12, 14- 17].

2. Разработанный метод трансплантации ЭСК в ретробульбарное пространство глаза кролика, в количестве 500 тысяч клеток в 0,3 мл физиологического раствора, стабилизирует процесс развития ТОНП. Наибольшая стабилизация процесса атрофии ганглионарных волокон каудальных отделов ДЗН отмечалась в группе с трансплантацией ЭСК, что подтверждено сравнением длины (в 4-ой -  $7,25 \pm 0,59 \times 10^3 \mu\text{m}$ , во 2 -ой -  $1,78 \pm 0,47 \times 10^3 \mu\text{m}$ , в 3-ей группе -  $0,95 \pm 0,48 \times 10^3 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ...  $p = 0,0001$ ...,  $p = 0,0001$ ...,  $U=0$ : Mann - Whitney U-test), и ширины пучков ганглионарных волокон (в 4-ой -  $1,13 \pm 0,12 \times 10^3 \mu\text{m}$ , во 2 -ой -  $0,46 \pm 0,06 \times 10^3 \mu\text{m}$ , в 3-ей группе -  $0,36 \pm 0,05 \times 10^3 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ...  $p = 0,0001$ ...,  $p = 0,0001$ ...,  $U=0$ : Mann - Whitney U-test), в группе контроля с ТОНП отмечался полный распад каудальных пучков ганглионарных волокон, что позволило обосновать преимущество и целесообразность применения клеточной терапии в практической медицине и разработать способ ауто трансплантации сегмента



лимба роговицы (АТСЛР) и комбинированный метод трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК). [1- 5, 8-12, 14- 17].

3. Аутооттрансплантация сегмента лимба роговицы (АТСЛР) (патент РБ №14927 от 23.06.2011г.) в супрахориоидальное пространство у пациентов с токсико-дегенеративным поражением зрительного нерва и сетчатки позволяет повысить остроту зрения в 1,82 раза (в контрольной группе в 1,1 раза) и расширить поле зрения на 64,8 градуса (в контрольной группе на 0,72 градуса), что свидетельствует о нейроретинопротективном эффекте вышеуказанного способа хирургического лечения. Анализ динамики показателей спектральной оптической когерентной томографии (СОКТ) сетчатки макулярной зоны до и через 6 месяцев после проведения операции АТСЛР установил статистически достоверное увеличение суммарной толщины слоев сетчатки. В фовеолярной зоне (central field thickness, у края ямки fovea) толщина сетчатки увеличилась на  $15,4 \pm 20,1 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05 \dots p = 0,005$ ,  $Z = 2,80$ : Wilcoxon test), в зоне average thickness (в 1 мм от fovea) толщина сетчатки увеличилась на  $23,6 \pm 12,5 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05 \dots p = 0,005$ ,  $Z = 2,80$ : Wilcoxon test). Экономический эффект (ЭЭ) от внедрения способа АТСЛР составил (по сравнению с традиционной операцией ревазуляризирующего типа) – 121194925 рублей. Общий удельный экономический эффект (ОУЭЭ) при внедрении указанного способа АТСЛР составил 4847797 рублей. Предполагаемый среднегодовой экономический эффект от внедрения способа АТСЛР на контингентах пациентов с дегенеративным заболеванием зрительного нерва в г. Минске был равен 1368965880 рублям. Коэффициент экономической эффективности (КЭЭти) способа АТСЛР по отношению к операции ревазуляризирующего типа - 6,88. [2, 22].

4. Комбинированный метод трансплантации аутологичных МСК в супрахориоидальное пространство и ткань теноновой оболочки, пациентам с дегенеративным поражением сетчатки и зрительного нерва, в количестве 3-5 млн. клеток, а также внутривенное введение в дозе 1 млн. клеток /кг м.т., сопровождается выраженным терапевтическим эффектом повышения остроты зрения в 1,84 раза ( $p < 0,05 \dots p = 0,01$ ,  $Z = 2,52$ : Wilcoxon test) и расширением поля зрения на 63,7гр. ( $p < 0,05 \dots p = 0,01$ ,  $Z = 2,52$ : Wilcoxon test), за счет уменьшения центральной скотомы. Комбинированный метод трансплантации аутологичных МСК в соответствующих дозах в супрахориоидальное пространство и ткань теноновой оболочки не вызывает воспалительных и аллергических реакций. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности клинического применения комбинированного метода трансплантации аутологичных МСК в качестве средства патогенетически обоснованной нейропротекции при лечении дегенеративной патологии сетчатки и зрительного нерва [2, 6, 7, 13, 18- 21, 23].

## Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Показаниями к проведению аутотрансплантации участка лимба роговицы [22] и трансплантации аутологичных МСК [23] являются:

- длительно существующий дегенеративный процесс сетчатки или зрительного нерва более 6-ти месяцев;
- множественность поражения;
- неэффективность стационарного, или амбулаторного консервативного лечения в течение 6 месяцев.

2. Противопоказаниями к проведению аутотрансплантации участка лимба роговицы [22] и трансплантации аутологичных МСК [23] являются:

- возраст пациента более 65 лет;
- беременность;
- субкомпенсированная и декомпенсированная глаукома;
- онкологические заболевания;
- системные заболевания соединительной ткани;
- сопутствующие заболевания с высоким риском оперативного вмешательства;
- наличие психических заболеваний или деменции;
- алкогольная болезнь.

3. При лечении дегенеративных заболеваний зрительного нерва и сетчатки методом комбинированной аутотрансплантации МСК [23] рекомендовано введение в супрахориоидальное пространство и ткань теноновой оболочки 3-5 млн клеток, в/венно 1млн. клеток на 1 кг массы тела.

## Список публикаций соискателя учёной степени

### Статьи в журналах

1. Беляковский, П. В. Влияние стволовых клеток на проявление каинатной оптиконеуропатии / П. В. Беляковский, Н. И. Позняк, Е. С. Лобанок // Офтальмология в Беларуси. – 2009. – № 1. – С. 91–96.
2. Беляковский, П. В. Перспективы применения стволовых клеток в офтальмологии / П. В. Беляковский, Е. С. Лобанок // Офтальмология в Беларуси. – 2009. – № 2. – С. 81–91.
3. Беляковский, П. В. Применение эмбриональных стволовых клеток и факторов роста стволовых клеток (stemcellfactor, lif) при токсическом поражении зрительного нерва у кроликов / П. В. Беляковский, Н. И. Позняк, Е. С. Лобанок // Рецепт. – 2009. – № 2. – С. 156–161.
4. Беляковский, П. В. Морфологические особенности нейропротекторного влияния эмбриональных стволовых клеток при токсической оптиконеуропатии / П. В. Беляковский, Н. И. Позняк // ARS medica. Искусство медицины. – 2009. – № 9. – С. 18–21.
5. Беляковский, П. В. Нейропротекторное влияние эмбриональных стволовых клеток при токсическом поражении зрительного нерва каиновой кислотой / П. В. Беляковский, Н. И. Позняк // Офтальмология в Беларуси. – 2010. – № 3. – С. 37–42.
6. Терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток в лечении дегенеративных изменений заднего отрезка глаза / П. В. Беляковский, Н. И. Позняк, С. Н. Позняк, Н. М. Ковшель // ARS medica. Искусство медицины. – 2012. – № 14. – С. 190–194.
7. Изменения в сетчатке и зрительном нерве под влиянием клеточной терапии / П. В. Беляковский, Н. И. Позняк, С. Н. Позняк, Н. М. Ковшель // Офтальмология. Вост. Европа. – 2014. – № 2. – С. 79–88.

### Материалы конференций

8. Влияние введения эмбриональных стволовых клеток и факторов роста стволовых клеток (StemCellFactor, LIF) на проявление каинатной оптиконеуропатии / Н. И. Позняк, П. В. Беляковский, Е. В. Барковский, А. С. Федулов, И. Д. Волоотовский // 7-й съезд офтальмологов Республики Беларусь, Минск, 23–24 марта 2007 г. – [Опубл. в журн.] Рецепт, 2007. – Прил. – С. 472–478.
9. Беляковский, П. В. Ингибирующее действие эмбриональных стволовых клеток на развитие каинатной оптиконеуропатии (КОНП) у кроликов / П. В. Беляковский // Современные аспекты клиники, диагностики и

лечения глазных болезней : материалы Междунар. науч. конф. посвящ. 100-ю со дня рождения акад. Н. А. Пучковской, Одесса, 29–30 мая 2008 г. / УЗ АМН Украины «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова»; редкол.: Н. В. Пасечникова [и др.]. – Одесса, 2008. – С. 146–147.

10. Эмбриональные стволовые клетки и каинатная оптиконейропатия / П. В. Беляковский, Н. И. Позняк, Е. В. Барковский, А. С. Федулов, Е. С. Лобанок, И. Д. Волотовский // Актуальные проблемы офтальмологии : 3-я Всерос. науч. конф. молодых ученых с участием иностр. специалистов : сб. науч. работ / под ред. Х. П. Тахчиди. – М., 2008. – С. 179–180.

11. Возможность ингибирования токсической оптиконейропатии эмбриональными стволовыми клетками / Н. И. Позняк, П. В. Беляковский, Е. В. Барковский, А. С. Федулов, Е. С. Лобанок, И. Д. Волотовский // Состояние и перспективы трансплантологии : материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 9–10 окт. 2008 г. / ред.: В. С. Кушниренко [и др.]. – Минск, 2008. – С. 44–46.

12. Нейропротекторное влияние эмбриональных стволовых клеток при токсической оптиконейропатии / Н. И. Позняк, П. В. Беляковский, Е. В. Барковский, А. С. Федулов, Е. С. Лобанок, И. Д. Волотовский // Достижения современной биологии, химии и медицины : сб. науч. тр. участников респ. конф. посвящ. 100-летию со дня рождения В. А. Бондарина / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред.: Е. В. Барковского, А. В. Бутвиловского. – Минск, 2009. – С. 52–56.

13. Аутотрансплантация мезенхимальных стволовых клеток в лечении центральной дистрофии сетчатки / П. В. Беляковский, Н. И. Позняк, С. Н. Позняк, Н. М. Ковшель // Актуальные проблемы детской офтальмологии : материалы респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – [Опубл. в журн.] Офтальмология. Вост. Европа. – 2012. – Спец. вып. – С. 68–73.

14. Беляковский, П. В. Морфология изменений в сетчатке и зрительном нерве под влиянием клеточной терапии / П. В. Беляковский // Новые технологии в офтальмологии : материалы Всерос. науч.-практ. конф., Казань, 18–19 апр. 2014 г. – Казань, 2014. – С. 25–29.

#### **Тезисы докладов**

15. Influence of embrional stem cells and actors of growth of stem cells on toxic neuroopticopatia / N. I. Pozniak, P. V. Beliakouskiy, A. V. Barkovsky, A. S. Fedulov, I. D. Volotovskiy // 25 Congress of the ESCRS, Stockholm, 8–12 Sept. 2007 : Book of abstracts. – Stockholm, 2007. – P. 249.

16. Beliakouski, P. The influence of embryonal stem cells on toxic neuroopticopathy / P. Beliakouski // 21<sup>st</sup> International Congress of German Ophthalmic Surgeons, Nuernberg 2008. – Nuernberg, 2008. – RN 745-220-363.

17. Beliakouski, P. The influence of embryonal stem cells on toxic opticoneuropathy / P. Beliakouski // 2009 SOE Congress, June 13–16 2009, Amsterdam, the Netherlands. – Amsterdam, 2009. – FP-RET-078.

18. Beliakouski, P. The influence of mesenchymal stem cells in macular degeneration / P. Beliakouski, N. Pozniak, N. Kovchel // Nordic Congress of Ophthalmology (NOK). – Helsenki, 2012. – UI 1919246.

19. Mesenchymal stem cells in macular and optic nerve degeneration / P. Beliakouski, M. Pazniak, S. Pazniak, M. Kovchel // The 31 Congress of the ESCRS, Oct. 5–9 2013, Amsterdam, Netherlands. – Amsterdam, 2013. – FP-3371.

20. Практическое применение метода аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток в лечении дистрофии сетчатки / П. В. Беляковский, Н. И. Позняк, С. Н. Позняк, Н. М. Ковшель // Федоровские чтения – 2014 : XII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием : сб. тез., Москва, 19–20 июня 2014 г. / под общ. ред. Б. Э. Малюгина. – М., 2014. – С. 24.

21. Beliakouski, P. Changes in the retina and optic nerve under the influence of cell therapy / P. Beliakouski // 5<sup>th</sup> Eu Cornea Congress, London 2014, 12–13 Sept. – London, 2014. – FP-5264.

### **Патент на изобретение**

22. Способ хирургического лечения дистрофических заболеваний сетчатки и зрительного нерва : пат. 14927 Респ. Беларусь, МПК 2006 А 61F 9/00 / Н. И. Позняк, П. В. Беляковский, Н. М. Ковшель, С. Н. Позняк, Е. В. Барковский, И. Д. Волотовский, Е. С. Лобанок ; дата публ.: 30.10.2011.

### **Инструкция по применению**

23. Комбинированный метод лечения дегенеративной патологии заднего отрезка глазного яблока с использованием трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 17.10.2014 / Фил. Открытого акционер. о-ва «Минский тракторный завод» «Медицинский центр-МТЗ», БГМУ ; Н. И. Позняк, П. В. Беляковский, Л. Н. Марченко, С. Н. Позняк, Н. М. Ковшель. – Минск, 2013. – 14 с.

**РЭЗІЮМЭ****Бемякоўскі Павел Васільевіч****Прымяненне клеткавых тэхналогій ў лячэнні таксічных і дэгенератыўных паражэнняў глядзельных нерваў і сятчаткі (эксперыментальна-клінічнае даследаванне)**

**Ключавыя словы:** таксічная оптыканейрапатыя, эмбрыянальныя ствалавыя клеткі (ЭСК), дэгенератыўная паталогія, глядзельны нерв, сятчатка, мезенхімальныя ствалавыя клеткі (МСК).

**Мэта даследавання:** распрацаваць і ўкараніць у клінічную практыку эксперыментальна абгрунтаваную метадку прымянення клеткавых тэхналогій для лячэння пацыентаў з токсіка-дэгенератыўнымі паразамі глядзельнага нерва і сятчаткі, заснаваную на аўталагічнай трансплантацыі сегмента лімба рагавіцы (АТСЛР) і трансплантацыі аўталагічных мезенхімальных ствалавых клетак (МСК).

**Метады даследавання:** эксперыментальны, інструментальны, гісталагічныя, мікраскапічны, клініка-дыягнастычны аб'ектыўны і інструментальны.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.**

Праведзеная эксперыментальная частка дазволіла наглядна прадэманстраваць, марфалагічна абгрунтаваную нэйрапрацэктывую функцыю ЭСК, пры таксічным паразе гангліярных валокнаў глядзельнага нерва і сятчаткі. Дадзеныя дынамікі глядзельных функцый у групам аутатрансплантацыі сегмента лімба рагавіцы (АТСЛР) (вастрыня гледжання павысілася (ВГ) у 1,82 разы ( $p < 0,05 \dots p = 8,9 \times 10^{-5}$ ,  $Z = 3,919$ : Wilcoxon test), поле зроку (ПЗ) пашырылася на 64,8 гр. ( $p < 0,05 \dots p = 0,000196$ ,  $Z = 3,723555$ : Wilcoxon test)) і камбінаванага метаду трансплантацыі аўталагічных МСК (ВЗ павысілася ў 1,84 разы ( $p < 0,05 \dots p = 0,01$ ,  $Z = 2,52$ : Wilcoxon test), ПЗ пашырылася на 63,7гр. ( $p < 0,05 \dots p = 0,01$ ,  $Z = 2,52$ : Wilcoxon test)), у пацыентаў з дэгенератыўнай паталогіяй глядзельнага нерва і сятчаткі, дэманструюць стабілізуючы эффект ад ужывальных метадаў.

**Практычная значнасць:** прымяненне распрацаваных метадаў хірургічнай карэкцыі дэгенератыўнай паталогіі глядзельнага нерва і сятчаткі, дасць магчымасць павысіць эфектыўнасць лячэння ва ўмовах стацыянара кароткатэрміновага знаходжання, знізіць колькасць амбулаторных наведванняў, у тым ліку і выдаткаў на лячэнне (каэфіцыент эканамічнай эфектыўнасці (КЭЭти) – 6,88).

**Вобласць ужывання:** афтальмологія.

## РЕЗЮМЕ

Беляковский Павел Васильевич

### **Применение клеточных технологий в лечении токсических и дегенеративных поражений зрительного нерва и сетчатки (экспериментально-клиническое исследование)**

**Ключевые слова:** токсическая оптиконеуропатия (КОНП), эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), дегенеративная патология, зрительный нерв (ЗН), сетчатка, мезенхимальные стволовые клетки (МСК).

**Цель исследования:** разработать и внедрить в клиническую практику экспериментально обоснованную методику применения клеточных технологий для лечения пациентов с токсико-дегенеративными поражениями зрительного нерва и сетчатки, основанную на аутологичной трансплантации сегмента лимба роговицы (АТСЛР) и трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

**Методы исследования:** экспериментальный, инструментальный, гистологический, микроскопический, клинико-диагностический объективный и инструментальный.

#### **Полученные результаты и их новизна.**

Проведенная экспериментальная часть позволила наглядно продемонстрировать морфологически обоснованную нейропротективную функцию ЭСК, при токсическом поражении ганглионарных волокон зрительного нерва и сетчатки. Данные динамики зрительных функций в группах аутоотрансплантации сегмента лимба роговицы (АТСЛР) (острота зрения повысилась (ОЗ) в 1,82 раза ( $p < 0,05 \dots p = 8,9 \times 10^{-5}$ ,  $Z = 3,919$ : Wilcoxon test), поле зрения (ПЗ) расширилось на 64,8 гр. ( $p < 0,05 \dots p = 1,96 \times 10^{-5}$ ,  $Z = 3,72$ : Wilcoxon test)) и комбинированного метода трансплантации аутологичных МСК (ОЗ повысилась в 1,84 раза ( $p < 0,05 \dots p = 0,01$ ,  $Z = 2,52$ : Wilcoxon test), ПЗ расширилось на 63,7 гр. ( $p < 0,05 \dots p = 0,01$ ,  $Z = 2,52$ : Wilcoxon test)), у пациентов с токсико-дегенеративной патологией зрительного нерва и сетчатки, демонстрируют стабилизирующий эффект от разработанных методов.

**Практическая значимость:** применение разработанных методов хирургической коррекции дегенеративной патологии зрительного нерва и сетчатки позволит повысить эффективность лечения в условиях стационара краткосрочного пребывания, снизить количество амбулаторных посещений, в том числе и расходов на лечение (коэффициент экономической эффективности (КЭЭти) – 6,88).

**Область применения:** офтальмология.

**SUMMARY****Beliakouski Pavel****The use of cell technologies in treatment of toxic and degenerative damage of the optic nerve and retina (experimental clinical research)**

**Key terms:** toxic optic neuropathy, embryonic stem cells, degenerative pathology, optic nerve, retina, mesenchymal stem cells.

**The objective of the research:** to develop and introduce into clinical practice experimentally confirmed methodology of the use of cellular technologies of autologous transplantation of corneal limbus segments and transplantation of autologous mesenchymal stem cells in treating patients with toxic and degenerative diseases of the optic nerve and retina.

**Methods of research:** experimental, instrumental, histological, microscopic, objective and instrumental clinicodiagnostic.

**Obtained results and their novelty.** The experiment carried out within the research vividly shows a morphologically grounded neuroprotective function of embryonic stem cells in toxic damage of the ganglionic fibers of the optic nerve and retina. The data for the dynamics in the visual functions in groups with autologous transplantation of a limbal segment of the cornea (vision increased 1.82 times ( $p < 0.05 \dots p = 8.9 \times 10^{-5}$ ,  $Z = 3.919$ : Wilcoxon test), visual field expanded 64.8 degrees. ( $p < 0.05 \dots p = 1.96 \times 10^{-5}$ ,  $Z = 3.72$ : Wilcoxon test)) and complex transplantation of autologous mesenchymal stem cells (vision increased 1.84 times ( $p < 0.05 \dots p = 0.01$ ,  $Z = 2.52$ : Wilcoxon test), visual field expanded 63.7 degrees. ( $p < 0.05 \dots p = 0.01$ ,  $Z = 2.52$ : Wilcoxon test)), in treating the patients with toxic and degenerative pathology of the optic nerve and retina showed a stabilizing effect of the employed methods.

**Practical value.** The use of the developed methods of surgical correction of degenerative pathology of the optic nerve and retina will lead to the increase in effectiveness of treatment in short-term health-care facilities, reduces the number of follow-up visits as well as the cost of treatment (coefficient of economic efficiency – 6.88).

**Sphere of application:** ophthalmology.