

# ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА СУСПЕНЗИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ГЛАЗ ДОНОРОВ-ТРУПОВ, ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *EX VIVO*

Д.С. Островский<sup>1</sup>, С.А. Борзенко<sup>1, 2</sup>, Б.Э. Малюгин<sup>1, 2</sup>, О.П. Антонова<sup>1</sup>, М.Х. Хубецова<sup>1</sup>, Т.З. Керимов<sup>1, 2</sup>

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

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

**Актуальность.** По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания роговицы являются одной из основных причин слепоты во всем мире. Одним из этиологических факторов, приводящих к поражению роговицы, являются эндотелиальные дистрофии. Эндотелий роговицы представляет собой монослой клеток, практически не обладающих митотической активностью. При снижении плотности эндотелиальных клеток роговицы ниже критического порога эндотелий утрачивает способность регулировать гидратацию стромы роговицы, что приводит к ее помутнению, и как следствие, снижению остроты зрения и качества жизни пациента. В связи с этим в клинической практике широко используются различные варианты кератопластики. На сегодня существует техническая возможность как пересадки всех слоев роговицы в случае сквозной кератопластики, так и трансплантации заднего эпителия в ходе послойных кератопластических операций. Данные хирургические подходы широко вошли в повседневную практику, однако требуют использования дефицитного материала – трупных донорских роговиц, из которых в условиях глазного тканевого банка формируют трансплантаты для вышеупомянутых операций. В связи с этим в последние годы предложены протоколы получения культуры эндотелиальных клеток роговицы человека для последующей трансплантации, однако использование подобных подходов на территории России ограничено законом. **Целью** данного исследования явилось экспериментальное обоснование возможности трансплантации некультивируемых эндотелиальных клеток, выделенных из трупных человеческих роговиц. **Материалы и методы.** Первый этап работы состоял в получении суспензии эндотелиальных клеток из трупных донорских роговиц и ее изучении, на втором этапе выполнялась оценка трансплантационной эффективности полученной клеточной суспензии в эксперименте *ex vivo*. **Результаты.** В результате проведенных исследований показана высокая жизнеспособность и сохранность фенотипа клеток после трансплантации предлагаемым методом. **Выводы.** Полученные данные позволяют сделать вывод о сохранности фенотипа и способности к адгезии, а также о высоком уровне жизнеспособности клеточной суспензии при адекватной потере эндотелиальных клеток в ходе трансплантации в эксперименте *ex vivo*.

**Ключевые слова:** роговица, эндотелий, задний эпителий, трансплантация, клетки.

**Для корреспонденции:** Островский Дмитрий Сергеевич. Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а, стр. 1. Тел. (499) 488-85-58. E-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

**Corresponding author:** Dmitriy Ostrovskiy. Address: 59a, Beskudnikovsky Bulvar, Moscow, 127486, Russian Federation. Phone: (499) 488-85-58. E-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

# PREPARATION AND EVALUATION OF A SUSPENSION OF HUMAN CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS ISOLATED FROM THE EYES OF CADAVERIC DONORS FOR TRANSPLANTATION IN AN EX VIVO EXPERIMENT

D.S. Ostrovsky<sup>1</sup>, S.A. Borzenok<sup>1, 2</sup>, B.E. Malyugin<sup>1, 2</sup>, O.P. Antonova<sup>1</sup>, M.Kh. Khubetsova<sup>1</sup>, T.Z. Kerimov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

**Background.** According to the World Health Organization, corneal diseases are one of the major causes of blindness globally. Endothelial dystrophy is one of the etiological factors leading to corneal diseases. The corneal endothelium is a monolayer of cells with virtually no mitotic activity. When the density of corneal endothelial cells falls below a critical threshold, the endothelium loses its ability to regulate corneal stromal hydration. This leads to corneal clouding and, consequently, to reduced visual acuity and quality of life of the patient. In this regard, various keratoplasty methods are widely used in clinical practice. Today, it is technically possible to transplant all corneal layers via penetrating keratoplasty, and to transplant the posterior epithelium via layer-by-layer keratoplasty. These surgical approaches are now widely used in everyday practice, but they require the use of scarce material – cadaveric donor corneas, from which grafts for the above-mentioned operations are formed in the conditions of an eye bank. In this regard, protocols for obtaining human corneal endothelial cell (HCEC) culture for subsequent transplantation have been proposed in recent years. However, the use of such approaches in Russia is limited by the law. **The aim** of this study was to experimentally justify the possibility of transplanting uncultured endothelial cells, isolated from cadaveric human corneas. **Materials and methods.** The first stage of the work consisted of obtaining a suspension of endothelial cells from cadaveric donor corneas and studying it; at the second stage, the transplantation effectiveness of the resulting cell suspension was assessed in an *ex vivo* experiment. **Results.** The cell phenotype after transplantation by the proposed method had high viability and preservation. **Conclusions.** The presented results suggest that phenotype and adhesion ability are preserved, and that the cell suspension has a high level of viability under adequate loss of endothelial cells during transplantation in the *ex vivo* experiment.

**Keywords:** cornea, endothelium, posterior epithelium, transplantation, cells.

## ВВЕДЕНИЕ

Роговица представляет собой важнейшую оптическую среду глаза, поскольку на нее приходится большая часть преломляющей силы оптической системы глаза. Это обусловлено уникальным гистологическим строением данной ткани. Как известно, роговица является одной из частей фиброзной капсулы глаза и непосредственно контактирует с окружающей средой, по этой причине множество различных этиологических факторов способны приводить к повреждению роговицы.

По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания роговицы являются одной из основных причин слепоты во всем мире и находятся на 4-м месте в структуре инвалидности по зрению [1, 2]. В Российской Федерации примерно 18% от общего числа больных составляют помутнения роговицы, приводящие к частичной или полной потере зрения. Одной из причин помутнения роговицы является эндотелиальная дистрофия.

Задний эпителий (эндотелий) роговицы человека представлен монослоем клеток гексагональной

формы, расположенных на внутренней поверхности роговицы. Он играет важнейшую роль в реализации гидробаланса роговицы, регулируя приток водянистой влаги к строме, обеспечивая тем самым ее прозрачность. При этом клетки заднего эпителия роговицы практически не способны к митотическому делению, и в случае гибели одной из клеток соседние клетки мигрируют в зону дефекта и/или увеличиваются в размере для закрытия дефекта монослоя. Физиологической нормой считается потеря примерно 0,6% клеток за год жизни. При падении плотности эндотелиальных клеток роговицы ниже критического порога, который составляет приблизительно 500 клеток/мм<sup>2</sup>, эндотелий утрачивает способность регулировать гидратацию стромы роговицы, что приводит к помутнению роговицы, и как следствие, снижению остроты зрения [3].

Основным методом лечения эндотелиальных дистрофий является кератопластика. На сегодня произошел значительный прогресс в способах трансплантации, который выражается в переходе от сквозной кератопластики, подразумевающей замену всех слоев роговицы, но сопровождающуюся высоким риском

осложнений, к пересадке непосредственно десцеметовой мембраны с эндотелиальными клетками, позволившей значительно снизить риск осложнений [4]. Однако в связи с выраженной нехваткой донорского материала во всем мире ведутся работы, направленные на получение культуры клеток эндотелия человека для последующей трансплантации.

В 2018 г. группой японских ученых во главе с профессором S. Kinoshita впервые была проведена успешная трансплантация культивированных эндотелиальных клеток роговицы с помощью ингибитора Rho-киназы у пациентов с диагнозом «буллезная кератопатия». Обязательным условием было нахождение пациента в вынужденном положении после операции вниз головой на протяжении 3 часов. Данная методика показала высокую клиническую эффективность на протяжении многолетнего срока наблюдения за данными пациентами. Через 5 лет после операции нормальная функция эндотелия роговицы была восстановлена в 10 из 11 прооперированных глаз, плотность эндотелиальных клеток (ПЭК) центральной части роговицы составила  $1257 \pm 467$  клеток/мм<sup>2</sup>, острота зрения статистически значимо увеличилась на 10 глазах [5].

В том же году группой ученых из Японии и Индии были представлены результаты трансплантации эндотелиальных клеток роговицы человека на примере трех пациентов с диагнозом «буллезная кератопатия», у которых отсутствовала положительная динамика на проводимую медикаментозную терапию. Трансплантацию культивированных эндотелиальных клеток роговицы в переднюю камеру выполняли, используя нанокомпозитный гель, с целью снижения миграции клеток в структуры передней камеры глаза. Обязательным условием было нахождение пациента вниз лицом на протяжении 24 часов. Клетки из кадаверных глаз культивировали 26 дней, затем полученную клеточную культуру переносили на гелевый носитель, срок сокультивирования с которым составлял одну неделю. Полученные гелевые носители трансплантировали 3 пациентам через канюлю 23 G. Закрытие эндотелиального дефекта у пациентов наблюдалось уже спустя 11 дней. Затем гелевый носитель удаляли из передней камеры пациентов. В двух случаях из трех удалось добиться значительного увеличения остроты зрения на сроке наблюдения до 18 месяцев.

Одним из ключевых вопросов трансплантации эндотелиальных клеток является изучение их нативного фенотипа и его сохранности в процессе выделения и культивирования. Для изучения фенотипа эндотелиальных клеток наиболее часто используют иммуноцитохимический метод окрашивания на следующие маркеры, встречающиеся почти во всех научных сообщениях: положительные Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>АТФ-аза; ZO-1, Ki67 и отрицательные виментин и α-SMA.

Данную совокупность маркеров многие исследователи принимают за базовую характеристику эндотелиальных клеток роговиц человека [6].

Однако представленные методики имеют ряд ограничений для осуществления на территории Российской Федерации по причине наличия ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах», препятствующего непосредственному применению культивированных клеток в клинике. Для создания оригинальной методики трансплантации эндотелиальных клеток, которая не вступала бы в противоречие с действующим Законом, нами была сформулирована цель данного исследования.

**Цель:** экспериментальное обоснование возможности трансплантации некультивируемых эндотелиальных клеток, выделенных из трупных человеческих роговиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1-й этап

*Получение жизнеспособных и фенотипически сохранных эндотелиальных клеток из трупных человеческих роговиц*

Для выполнения данного этапа работы из Глазного тканевого банка были получены 9 роговиц с жизнеспособным эндотелием, но не пригодных для трансплантации пациентам по причине наличия стромальных повреждений. Исследования с использованием биоматериала, выделенного из трупных глаз человека, проводили в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства Российской Федерации. Средний возраст доноров составил  $53 \pm 4$  года, соотношение мужчин/женщин составляло соответственно 5/4. Среднее время от момента смерти до ввода в эксперимент составляло  $20 \pm 3$  часа. По классификации трансплантабельности, предложенной С.А. Борзенком, полученные роговицы соответствовали оценке 1А (нетрансплантабельные роговицы).

### Выделение суспензии эндотелиальных клеток

Выделение суспензии эндотелиальных клеток из трупных донорских роговиц выполнялось по следующему протоколу. Вначале проводилось хирургическое выделение десцеметовой мембраны с эндотелиальными клетками. Затем осуществляли перенос десцеметовой мембраны и эндотелиальных клеток в пробирку для ферментативной обработки раствором химически стабильного трипсина TrypLE (Thermo Fisher Scientific, США), после чего пробирки переносили в термощейкер TS-100 (BioSan SIA, Латвия), используя следующие настройки прибора: температура постоянного нагрева 37 °C, 800 об/мин, 40 мин. По окончании данной процедуры пробирки

центрифугировали, удаляли супернатант, добавляли культуральную среду следующего состава: DMEM/F12; 5% эмбриональная телячья сыворотка; 2 ммоль L-глутамин; L-аскорбиновая кислота; эпидермальный фактор роста (EGF); инсулин; ингибитор Rho-киназы (ROCK) Y-27632; раствор антибиотиков и антимикотиков в объеме 1 мл, после чего проводили подсчет количества клеток на автоматизированном счетчике клеток Luna II (Logos, Южная Корея).

### Определение жизнеспособности

Жизнеспособность полученной суспензии определяли методом флуоресцентной окраски с использованием коммерческого набора Live and Dead (Abcam plc., Великобритания). Набор представляет собой флуоресцентные красители, которые окрашивают мертвые клетки в красный цвет, живые клетки – в зеленый цвет. Для анализа из полученной суспензии отбирали аликвоты по 5 мкл и смешивали с раствором красителя 5X для последующей конфокальной микроскопии. Оценку проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего биологического микроскопа FluoView FV10i (Olympus Corporation, Япония).

Для определения жизнеспособности и апоптоза были использованы красители 7AAD и Annexin V, для этого отбирали 50 мкл суспензии и смешивали с красителями. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

### Проточная цитофлуориметрия

Для подтверждения сохранности фенотипа суспензии эндотелиальных клеток была проведена проточная цитофлуориметрия по протоколу на CD-панели, предложенной Kinoshito. Описание протокола: было сформировано 3 пробирки по  $1 \times 10^5$  клеток, в 1-ю пробирку были добавлены изотопические контроли, во 2-ю пробирку – CD166 APC 750, CD44 PC7, CD24 PE, в 3-ю – CD105 APC, CD26 PC7, CD133 FITC. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

## 2-й этап

### Оценка трансплантационной эффективности полученной клеточной суспензии в эксперименте *ex vivo*

Для второго этапа использованы трупные донорские роговицы с показателем трансплантативности 1A,  $n = 4$ . Трансплантацию клеточной суспензии на заранее подготовленные трупные донорские роговицы со стандартной зоной дефекта проводили в стерильных условиях из расчета 1 тыс. клеток/мм<sup>2</sup> с последующим культивированием в течение 1 недели в полной культуральной среде следующего состава: DMEM/F12; 5% эмбриональная телячья сыворотка; 2 ммоль L-глутамин; L-аскорбиновая кислота; эпи-

дермальный фактор роста (EGF); инсулин; ингибитор Rho-киназы (ROCK) Y-27632; раствор антибиотиков и антимикотиков. Для трансплантации использовали шприц со стеклянным наконечником объемом 0,2 мл при диаметре носика наконечника не более 2 мм, что позволяет оптимизировать проводимые микрохирургические манипуляции с клеточной суспензией.

Основные этапы трансплантации суспензии эндотелиальных клеток включали механическое удаление нативного эндотелия при помощи стерильного тупфера, определение зоны дефекта окрашиванием трипановым синим, перенос подготовленной суспензии эндотелиальных клеток при помощи стеклянного наконечника на роговицу из расчета 1 тыс. клеток/мм<sup>2</sup> на 100 мкл полной культуральной среды. Далее роговицы культивировали в 7 мл полной ростовой среды в 6-луночной планшете. Культивирование осуществляли в течение 7 дней.

### Иммуногистохимическое исследование

По окончании культивирования для верификации функциональной активности трансплантированных клеток заднего эпителия роговицы было проведено иммуногистохимическое исследование на следующие маркеры: белок плотных межклеточных контактов (ZO-1), функциональные белки Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТ-Фаза, Люмикан, Виментин и белок пролиферативной активности Ki67. Роговицы однократно промывали стерильным раствором PBS с последующей фиксацией в 10% формалине в течение суток. Протокол ИГХ-исследования включал в себя следующие основные этапы: пермобилизация 0,1% Triton X100, блокировка неспецифического связывания раствором 0,3% Tween 20 и 1% альбумина, инкубирование с первичными и вторичными антителами, ядра контрастировали ядерным красителем Hoechst № 33258. Анализ проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего биологического микроскопа FluoView FV10i (Olympus Corporation, Япония).

### Электронно-сканирующая микроскопия

Для определения качества закрытия сформированного дефекта трансплантированными эндотелиальными клетками по окончании культивирования также была проведена электронная микроскопия роговиц. Полученные образцы однократно промывали стерильным раствором PBS с последующей фиксацией в 10% растворе формалина в течение суток. Дегидратацию образцов проводили в восходящей батарее ацетона, с последующей сушкой в критической точке, напылением золота и анализом на электронно-сканирующем микроскопе Jeol6000 plus (Jeol, Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1-й этап

На данном этапе была выделена суспензия эндотелиальных клеток с последующей оценкой их жизнеспособности и определением количества клеток,



Рис. 1. Суспензия эндотелиальных клеток. Световая фазово-контрастная микроскопия.  $\times 100$

Fig. 1. Endothelial cell suspension. Light phase-contrast microscopy.  $\times 100$

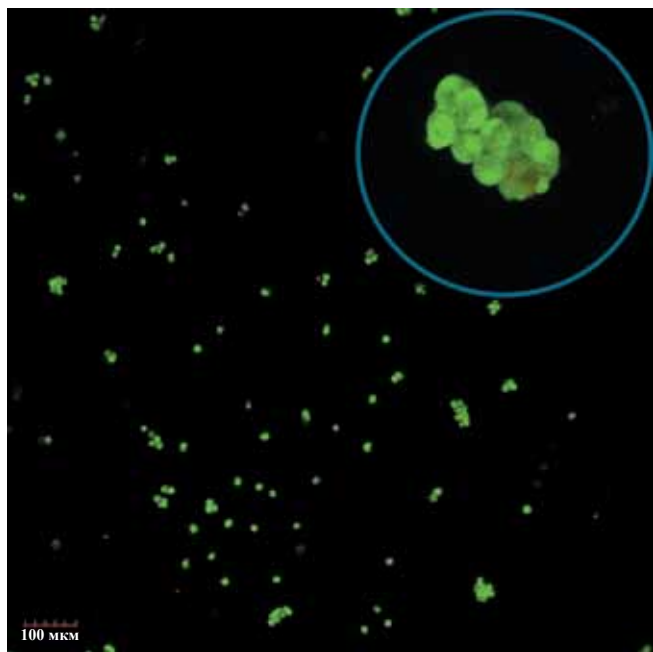


Рис. 2. Определение жизнеспособности суспензии эндотелиальных клеток: зеленым цветом окрашены живые клетки, красным – мертвые. Иммуногистохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.  $\times 100$

Fig. 2. Determination of endothelial cell suspension viability: live cells are stained in green, dead cells in red. Immunohistochemical staining, confocal laser scanning microscope.  $\times 100$

находящихся в апоптозе. Было показано, что при ферментном способе выделения суспензия представлена одиночными клетками с единичными небольшими кластерами по 5–10 клеток (рис. 1). Количество жизнеспособных клеток в полученной суспензии составило  $98,07 \pm 1,21\%$  (рис. 2). Количество клеток в состоянии апоптоза  $0,1 \pm 0,012\%$ , мертвых клеток  $1,53 \pm 0,61\%$  (рис. 3).

При проведении проточной цитофлуориметрии была показана экспрессия более 98% CD166, небольшой уровень экспрессии CD105 и CD133 при отсутствующей экспрессии CD24, CD26 и CD44, что соответствует результатам Киношито и соавт. (рис. 4, 5).

### 2-й этап

Для трансплантации суспензии эндотелиальных клеток было предложено использовать стеклянный наконечник, который применяется в хирургии. К основным преимуществам этого наконечника можно отнести слабую адгезию клеток к стеклянным стенкам, внутренний объем, который позволяет суспензии клеток не контактировать с поршнем шприца, и малый диаметр носика, который позволяет оптимизировать хирургические манипуляции. Ранее нами было установлено, что потеря эндотелиальных клеток в стеклянном наконечнике составляет  $10 \pm 2,5\%$ , а всего при данном способе трансплантации потеря клеток составляет  $40 \pm 5,5\%$ .

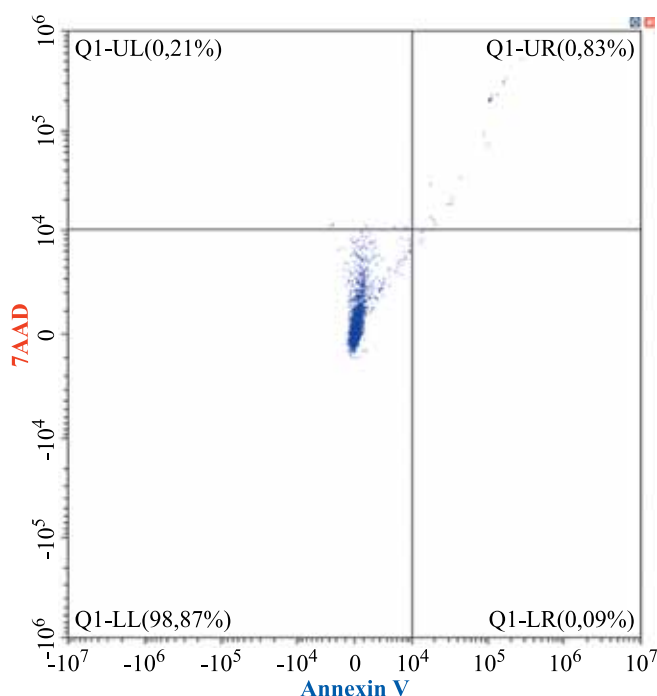


Рис. 3. Определение жизнеспособности и апоптоза суспензии эндотелиальных клеток. Проточная цитофлуориметрия

Fig. 3. Determination of viability and apoptosis of endothelial cell suspension. Flow cytometry

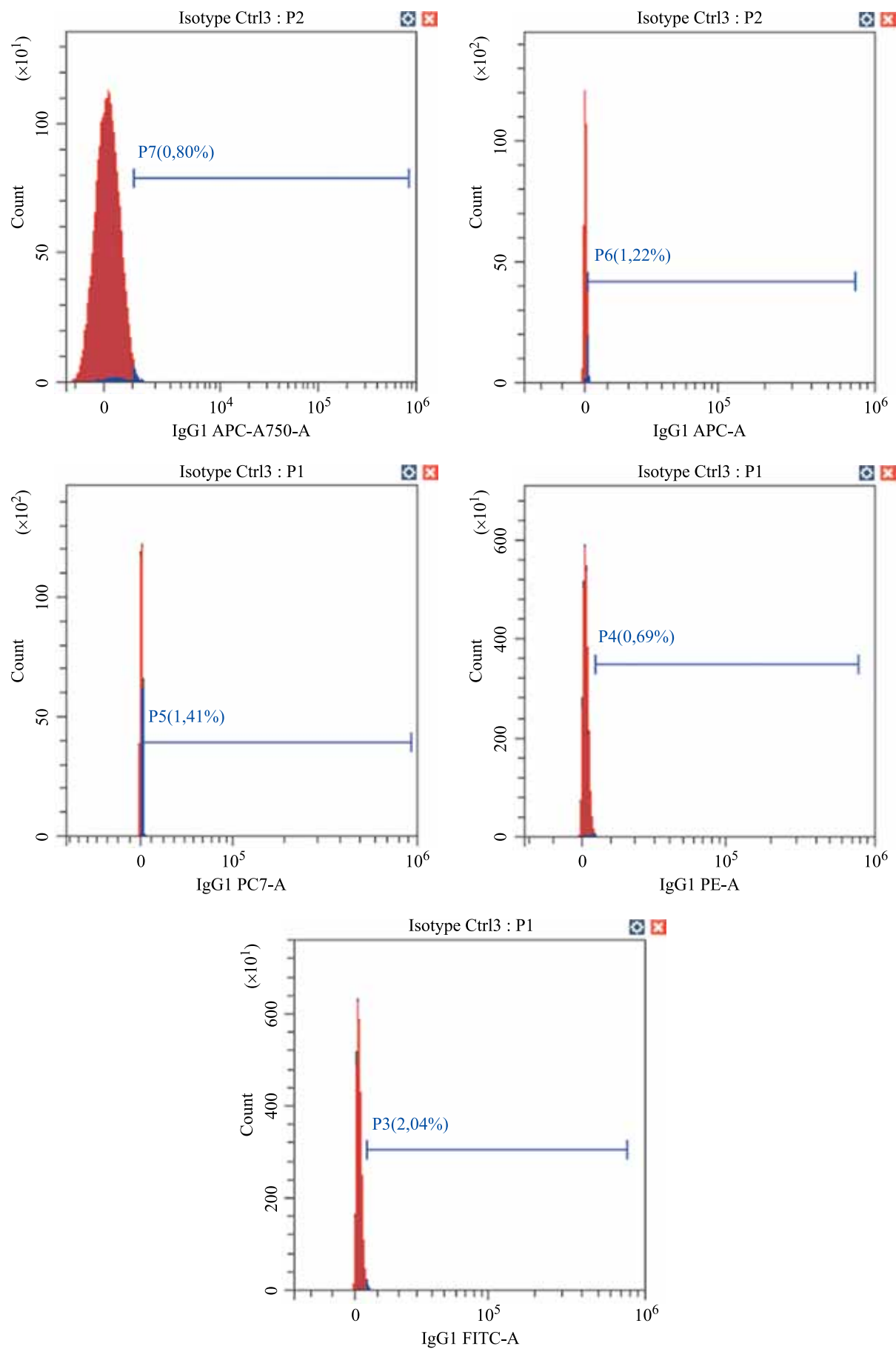


Рис. 4. Изотипический контроль. Проточная цитофлуориметрия

Fig. 4. Isotype control. Flow cytometry



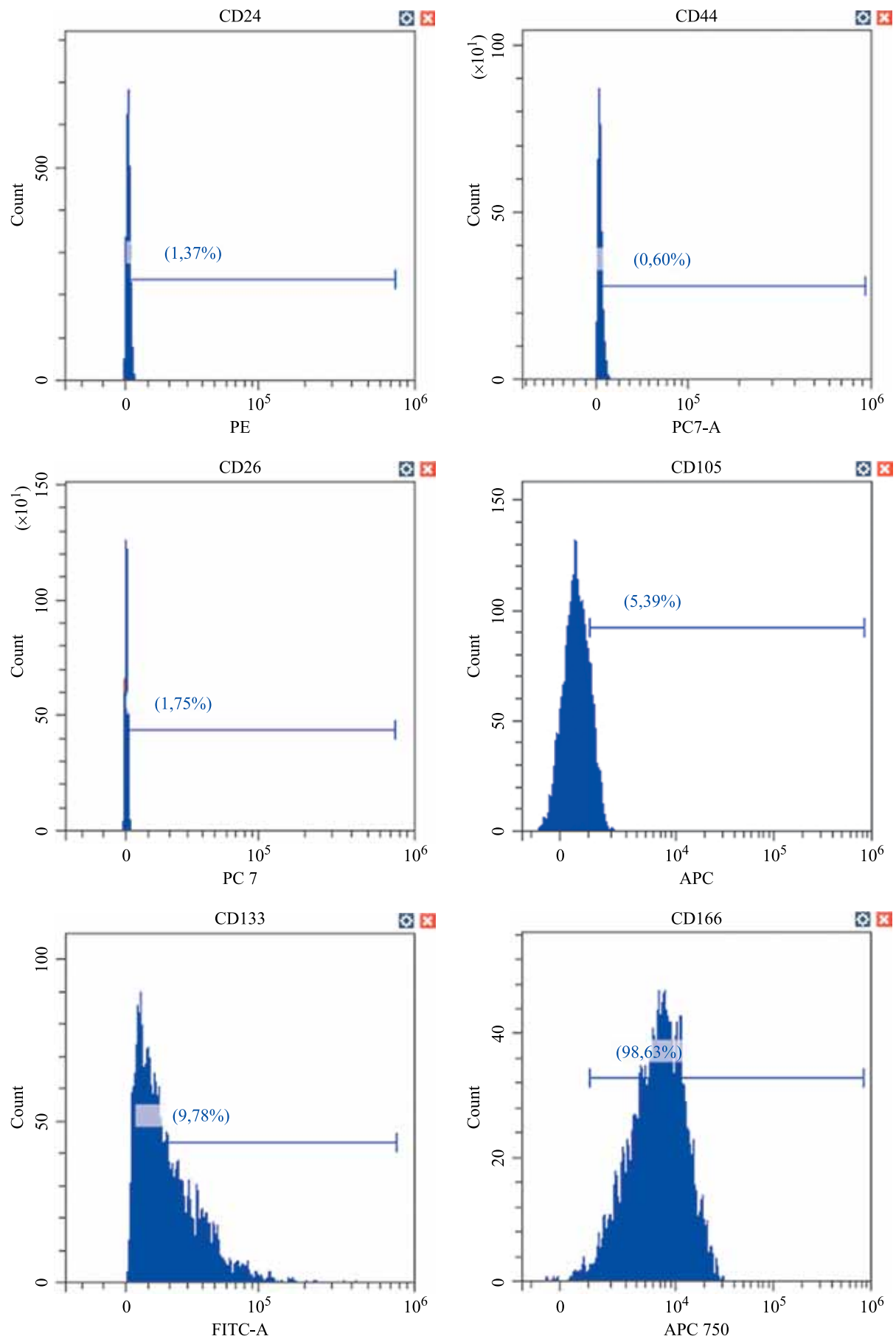


Рис. 5. Проточная цитофлуориметрия суспензии эндотелиальных клеток роговицы

Fig. 5. Flow cytometry of a corneal endothelial cell suspension

Авторский способ трансплантации заготовленной суспензии эндотелиальных клеток представлен на рис. 6.

По истечении 1 недели культивирования клеточной суспензии на роговицах было выполнено иммуногистохимическое исследование. В результате

проведенного исследования в образцах роговицы обнаружена экспрессия характерных маркеров эндотелиальных клеток: белка ZO-1 (маркер плотных межклеточных контактов),  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы (маркер сохранности насосной (помпальной) функции), белка Ki67 (маркер пролиферативной активности)

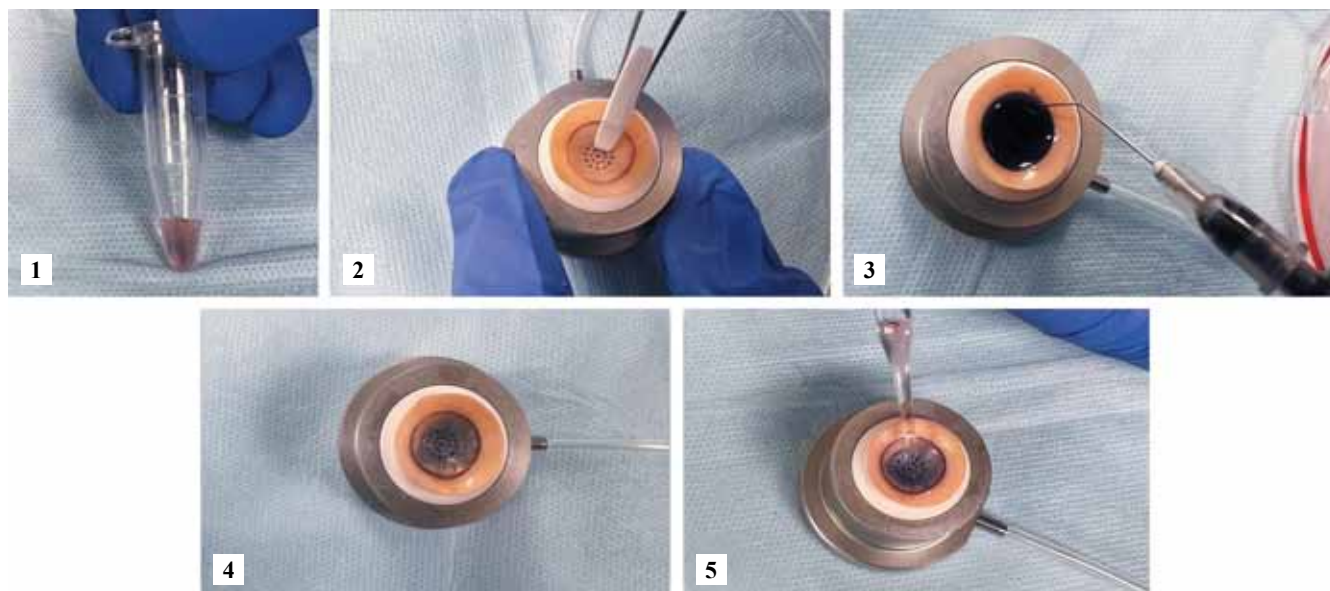


Рис. 6. Методика трансплантации суспензии эндотелиальных клеток заднего эпителия, основные этапы: 1 – подготовка суспензии клеток; 2 – удаление собственного (нативного) эндотелия; 3 – окрашивание зоны дефекта трипановым синим; 4 – определение зоны дефекта; 5 – внесение суспензии клеток эндотелия на зону дефекта

Fig. 6. Method of transplantation of a posterior epithelial endothelial cell suspension, main stages: 1 – preparation of cell suspension; 2 – removal of native endothelium; 3 – staining of defect area with trypan blue; 4 – identification of the defect area; 5 – application of the endothelial cell suspension into the defect area

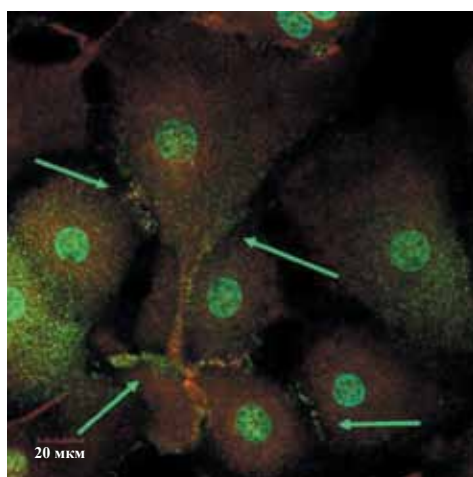


Рис. 7. Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы. Стрелками показана экспрессия белков ZO-1 (зеленые стрелки) и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы (красное окрашивание). Иммуногистохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.  $\times 600$

Fig. 7. Immunohistochemical analysis of corneal endothelial cells. Arrows indicate the expression of ZO-1 (green arrows) and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase proteins (red stain). Immunohistochemical staining, confocal laser scanning microscope.  $\times 600$

при наличии единичных клеток, экспрессирующих виментин (белок цитоскелета клеток соединительной ткани) и люмикан (белок, играющий важную роль в миграции и пролиферации клеток во время восстановления тканей, а также отвечающий за регуляцию сборки коллагенового матрикса в роговице). Полученные в ходе иммуногистохимического исследования изображения эндотелиальных клеток представлены на рис. 7–9.

С целью оценки способности полученной суспензии клеток к адгезии к десцеметовой мембране и последующего создания монослоя была выполнена сканирующая электронная микроскопия. По результатам проведенного исследования было показано, что клеточная суспензия эндотелиальных клеток сформировала монослой и закрыла зону дефекта. Полученные в ходе сканирующей электронной микроскопии изображения представлены на рис. 10, красными пунктирными линиями отмечены границы клеток.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Действующий Федеральный закон Российской Федерации «О биомедицинских клеточных продук-



тах» регулирует нормы использования клеточных продуктов на территории России. Согласно принятым положениям, на сегодня трансплантация культивированных *in vitro* клеток эндотелия роговицы практически неосуществима. По этой причине сегод-

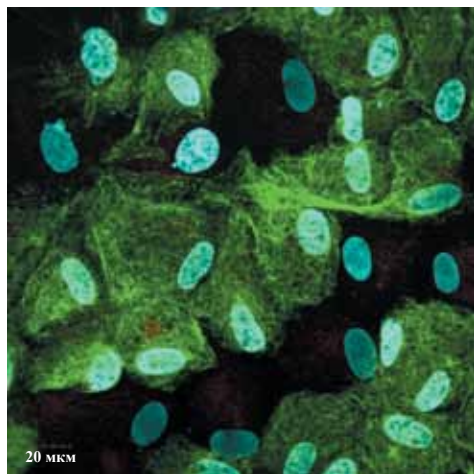


Рис. 8. Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы. Экспрессия белков люмикана (зеленое окрашивание) и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы (красное окрашивание). Иммуногистохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.  $\times 600$

Fig. 8. Immunohistochemical analysis of corneal endothelial cells. Expression of lumican proteins (green stain) and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (red stain). Immunohistochemical staining, confocal laser scanning microscope.  $\times 600$

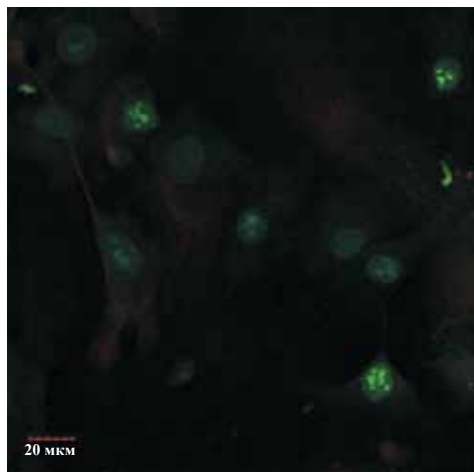


Рис. 9. Иммуногистохимический анализ клеток эндотелия роговицы. Экспрессия белка-маркера пролиферации Ki67 (зеленое окрашивание) и слабая экспрессия виментина (красное окрашивание). Иммуногистохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.  $\times 600$

Fig. 9. Immunohistochemical analysis of corneal endothelial cells. Expression of the proliferation marker protein Ki67 (green stain) and weak expression of vimentin (red stain). Immunohistochemical staining, confocal laser scanning microscope.  $\times 600$

ня нет возможности использовать опубликованные и успешно зарекомендовавшие себя алгоритмы трансплантации клеток заднего эпителия человеческой роговицы [5, 6]. В связи с этим в настоящем исследовании был использован собственный авторский способ трансплантации эндотелиальных клеток, который не вступает в противоречие с действующим законом, поскольку для трансплантации используются некультивируемые клетки заднего эпителия трупных донорских роговиц.

В результате проведенной трансплантации суспензии эндотелиальных клеток трупных донорских роговиц была обнаружена возможность их успешной адгезии на роговицу. Успешность трансплантации эндотелиальных клеток оценивали в ходе иммуногистохимического исследования и сканирующей электронной микроскопии. Фенотип полученных клеточных культур изучали по ряду маркеров, таких как  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза и ZO-1. Маркер ZO-1 является характерным белком плотных межклеточных контактов для клеток эпителиальной природы. Экспрессия данного маркера плотных межклеточных контактов ZO-1 показала сохранность эпителиального фенотипа исследуемых клеток после трансплантации представленным в данной работе способом. Оценка насосной (помпальной) функции трансплантированного заднего эпителия проводилась по оценке уровней экспрессии  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. В результате проведенного иммуногистохимического исследования были обнаружены высокие уровни экспрессии фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, на основании чего был сделан вывод о сохранности насосной функции клеток эндотелия, являющейся ключевой в поддержании гомеостаза роговицы, после трансплантации по указанной мето-

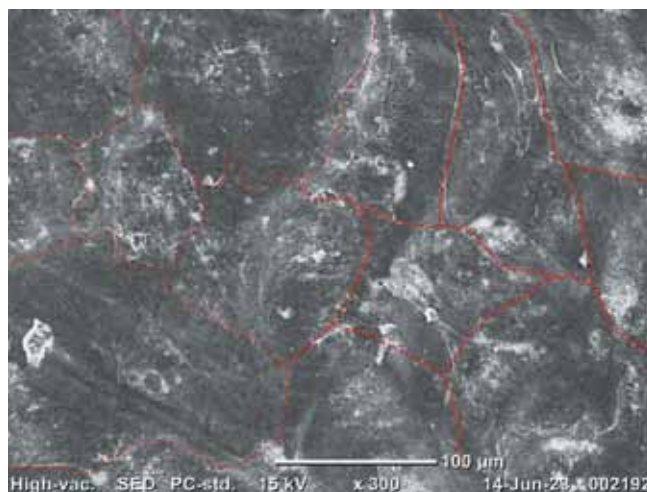


Рис. 10. Слой эндотелиальных клеток после культивирования на трупной донорской роговице. Сканирующая электронная микроскопия.  $\times 300$

Fig. 10. Endothelial cell layer after culturing on a cadaveric donor cornea. Scanning electron microscopy.  $\times 300$

дике. Также по незначительным уровням экспрессии белка виментина показано отсутствие эпителиально-мезенхимальной пластичности клеток. Выбор виментина обоснован известной ролью данного белка как маркера мезенхимальной трансформации клеток. Все использованные в данном исследовании белковые маркеры широко применяются при изучении эндотелия роговицы различными группами ученых [7, 8].

Была отмечена пылевидная экспрессия маркера ZO-1, в норме имеющая сотовидный характер, по-видимому, данный факт обусловлен разобщением монослоя эндотелиальных клеток при получении суспензии, в дальнейшем по мере восстановления монослоя и межклеточных контактов мы предполагаем полное восстановление данного маркера.

Предложенный способ трансплантации некультивированных клеток заднего эпителия при помощи стеклянного наконечника показал высокую эффективность и безопасность для клеток. Использование стеклянного наконечника обеспечило слабую адгезию клеток к стеклянным стенкам наконечника и тем самым низкую потерю эндотелиальных клеток на этапе непосредственного введения. Также достаточный внутренний объем наконечника позволяет суспензии клеток не контактировать с поршнем шприца, в то время как малый диаметр носика дает возможность оптимизировать хирургические манипуляции. По полученным данным, за счет названных особенностей стеклянного наконечника удалось достичь уровня потери клеток во время трансплантации не более 10%. В известных публикациях авторами также подчеркивается необходимость контроля за скоростью трансплантации для минимизации травматизма и наиболее деликатной хирургии [9]. Подобный контроль возможен при использовании стеклянного наконечника и проведении трансплантации по описанной методике.

## ВЫВОДЫ

1. Предложенный ферментный способ получения суспензии эндотелиальных клеток роговицы с использованием химически стабильного трипсина позволяет получить 98% жизнеспособных клеток.
2. Полученная клеточная суспензия эндотелиальных клеток экспрессирует 96% CD133, имеет слабую экспрессию CD105 и не экспрессирует CD24, 26, 44, что подтверждает сохранность фенотипа после ферментативного способа получения.
3. Предложенный способ трансплантации позволяет минимизировать внешнее воздействие на суспензию эндотелиальных клеток и уменьшить потерю клеток при хирургических манипуляциях до 10%.
4. Трансплантированная клеточная суспензия эндотелиальных клеток роговицы в эксперименте показала возможность адгезии данных клеток к десцеметовой мембране с формированием моно-

слоя и экспрессии характерных клеточных белков ZO-1,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и Люмикана.

*Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-00356.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Avadhanam VS, Smith HE, Liu C. Keratoprostheses for corneal blindness: a review of contemporary devices. *Clin Ophthalmol*. 2015 Apr 16; 9: 697–720. doi: 10.2147/OPTH.S27083. PMID: 25945031; PMCID: PMC4406263.
2. Wang EY, Kong X, Wolle M, Gasquet N, Ssekasanvu J, Mariotti SP et al. Global Trends in Blindness and Vision Impairment Resulting from Corneal Opacity 1984–2020: A Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2023 Aug; 130 (8): 863–871. doi: 10.1016/j.ophtha.2023.03.012. Epub 2023 Mar 22. PMID: 36963570; PMCID: PMC10355344.
3. Navaratnam J, Utheim TP, Rajasekhar VK, Shahdadar A. Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium. *J Funct Biomater*. 2015 Sep 11; 6 (3): 917–145.
4. Малугин БЭ, Шилова НФ, Анисимова НС, Антонова ОП. Трансплантация эндотелия и десцеметовой мембраны. *Вестник офтальмологии*. 2019; 135 (1): 98–103. Malugin BE, Shilova NF, Anisimova NS, Antonova OP. Transplantation of endothelium and Descemet's membrane. *Vestnik oftal'mologii*. 2019; 135 (1): 98–103.
5. Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanaka H et al. Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy. *N Engl J Med*. 2018 Mar 15; 378 (11): 995–1003. doi: 10.1056/NEJMoa1712770. PMID: 29539291.
6. Numa K, Imai K, Ueno M, Kitazawa K, Tanaka H, Bush JD et al. Five-Year Follow-up of First 11 Patients Undergoing Injection of Cultured Corneal Endothelial Cells for Corneal Endothelial Failure. *Ophthalmology*. 2021 Apr; 128 (4): 504–514. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.09.002. Epub 2020 Sep 6. PMID: 32898516.
7. Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*. 2004; 351 (12): 1187–1196.
8. Madden PW, Lai JN, George KA, Giovenco T, Harkin DG, Chirila TV. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. *Biomaterials*. 2011; 32: 4076–4084.
9. Li KV, Flores-Bellver M, Aparicio-Domingo S, Pet-rash C, Cobb H, Chen C et al. A Surgical Kit for Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Transplants: Collection, Transportation, and Subretinal Delivery. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Feb 18; 10: 813538. doi: 10.3389/fcell.2022.813538. PMID: 35252183; PMCID: PMC8895272.

*Статья поступила в редакцию 24.11.2023 г.  
The article was submitted to the journal on 24.11.2023*