

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-135-144

## ПРОБЛЕМА ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЦЕЛЕЙ

Д.С. Островский<sup>1</sup>, С.А. Борзенок<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

Клетки заднего эпителия роговицы человека, или эндотелия, обладают ограниченной пролиферативной активностью как *in vivo* так и *in vitro*. Повреждение или дисфункция этих клеток приводит к нарушению прозрачности роговицы различной степени выраженности, вплоть до слепоты. В настоящее время единственным действенным методом лечения патологии эндотелия является трансплантация донорской роговицы, содержащей пул здоровых и функционально активных клеток. Однако существует глобальная нехватка донорских роговиц, что приводит к неудовлетворенной клинической потребности и тому, что хирургическое лечение получает лишь 1 пациент из 10 нуждающихся. В связи с этим создание клеточных конструкций и искусственных аналогов роговицы человека, содержащих здоровый эндотелий, является весьма актуальной задачей современной офтальмо-трансплантологии. В данном обзоре представлены текущее состояние вопроса, сложности и перспективы получения клеточной культуры эндотелиальных клеток роговицы *in vitro* для целей трансплантации.

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

## CHALLENGES OF OBTAINING CULTURED CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS FOR REGENERATIVE PURPOSES

D.S. Ostrovskiy<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 Complex, Moscow, Russian Federation

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

Human posterior corneal epithelium (corneal endothelium) has limited proliferative activity both *in vivo* and *in vitro*. Disease or dysfunction in these cells leads to impaired corneal transparency of varying degrees of severity, up to blindness. Currently, the only effective standard treatment for corneal endothelial dysfunction is transplantation of donor cornea that contains a pool of healthy and functionally active cells. However, there is a global shortage of donor corneas, which has led to an unmet clinical need and the fact that only 1 patient out of 10 in need receives surgical treatment. Therefore, creation of cellular constructs and artificial human corneas containing healthy endothelium is a very urgent challenge facing modern ophthalmic transplantology. This review presents the current state of affairs, challenges and prospects for obtaining cultured corneal endothelial cells (CECs) *in vitro* for transplantation purposes.

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

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

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

## ВВЕДЕНИЕ

Роговица человека представляет собой прозрачную бессосудистую структуру, питание которой осуществляется в основном через влагу передней камеры посредством клеток заднего эпителия роговицы. Клетки заднего эпителия роговицы, иначе называемые эндотелием, имеют характерную гексагональную форму и образуют монослой, расположенный на десцеметовой мембране. Основная его функция заключается в поддержании роговицы в прозрачном, относительно дегидратированном состоянии посредством работы метаболических помп, опосредованных через Na/K АТФазу [1], а также барьерной функции через белки плотных контактов ZO-1 [2].

Известно, что плотность эндотелиальных клеток роговицы у новорожденных составляет примерно 6000 клеток/мм<sup>2</sup>, однако с возрастом происходит уменьшение количества клеток, ежегодная потеря которых составляет примерно 0,6% от общей популяции клеток в год [3]. У здоровых людей это естественное снижение плотности не приводит к каким-либо клинически значимым нарушениям структуры и функции роговицы. В случае более активной потери эндотелиальных клеток, например, вследствие хирургических вмешательств или травм глаза, может происходить частичное восстановление функциональной целостности эндотелиального слоя за счет миграции клеток и увеличения площади здоровых клеток [3]. 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 ее помутнению, и как следствие – снижению остроты зрения [3]. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2020 году заболевания роговицы являлись причиной снижения зрения у 7% населения земного шара и третьей по значимости причиной слепоты и слабовидения [4]. Длительное время сквозная кератопластика являлась «золотым стандартом» лечения эндотелиальной патологии роговицы, однако на сегодня на первое место выходят селективные методы послойной кератопластики, а именно задняя автоматизированная кератопластика (ЗАПК), при которой донорский трансплантат включает помимо эндотелия и десцеметовой мембраны слой стромы, и трансплантация десцеметовой мембраны (ТДМ), при которой трансплантируется только эндотелий с подлежащей десцеметовой мембраной [5–7]. Данные методики сегодня дают хорошие клинико-функциональные результаты, при этом продолжают совершенствоваться хирургические способы получения трансплантатов для послойной кератопластики [8, 9]. Однако организационные и медико-юридические проблемы, связанные с донорством, до сих пор ак-

туальны для многих стран мира, что объясняет дефицит донорского материала. С другой стороны, послеоперационная потеря эндотелиальных клеток после ЗАПК и ТДМ достигает 35% и более в год [10], что приводит к необходимости повторной кератопластики [11]. Повторная кератопластика в ряде развитых стран мира является вторым по частоте показанием к трансплантации роговицы [12].

Таким образом, существует реальная необходимость изучения альтернативных терапевтических путей, которые помогут уменьшить зависимость от донорского материала при лечении эндотелиальных патологий роговицы, а также повысить жизнеспособность трансплантированных эндотелиальных клеток как донора, так и реципиента.

## ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *IN VITRO* КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ

Одним из путей решения проблемы недостаточности эндотелия роговицы является применение культуры клеток [13]. Однако данные клетки слабо пролиферируют вследствие своего происхождения от клеток – предшественников нейронального гребня, а также контактного ингибирования и экспрессии во влаге передней камеры фактора TGF- $\beta$ , эндотелиальные клетки в своем подавляющем большинстве находятся в стадии G1 клеточного цикла [14].

Несмотря на это, во всем мире идут активные работы по получению культуры клеток эндотелия роговицы. Первое сообщение об успешном получении культуры эндотелия было сделано J. Mannagh et al. (1965). Предложенная ими методика включала в себя погружение выделенных корнеосклеральных дисков в раствор 0,06% проназы, инкубирование при 37 °C в течение 2 часов, с последующим соскабливанием клеток эндотелия. Культивирование осуществлялось в культуральной среде Игла с добавлением 6 г/л глюкозы и 20% фетальной бычьей сыворотки при стандартных условиях. В эксперименте использовали роговицы доноров в возрасте 28 и 70 лет. Авторы спустя 48 часов визуализировали прикрепившиеся округлые конгломераты клеток, которые через 72 часа принимали характерную эпителиальную морфологию. Однако уже на 10-й день клетки приобретали мезенхимоподобную морфологию, что свидетельствовало об их эпителиально-мезенхимальной трансформации [15].

Стоит отметить, что с момента получения первой культуры клеток эндотелия и до сих пор дискуссионными являются критерии отбора донорского материала, нет единого протокола выделения и культивирования, а также стандартного состава питательной среды и необходимых добавок. В данном обзоре мы приводим протоколы, которые способствовали получению клеточной культуры эндотелия роговицы,

не подвергшейся эпителиально-мезенхимальному переходу хотя бы до 2-го пассажа.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ДОНОРОВ

Joуse и Zhu провели сравнительный анализ возможности получения клеточной культуры эндотелия роговицы и смогли представить критерий отбора доноров (табл.) [16].

Кроме того, к критериям исключения относят наличие у донора сахарного диабета, глаукомы, генерализованной инфекции (сепсиса), а также проведение химиотерапии [17]. Однако, по мнению ряда отечественных авторов, диабет и онкологические заболевания (без стадии интоксикации) являются предпочтительным выбором донора, так как могут приводить клетки эндотелия к митозу [18, 19].

М. Parekh и S. Ahmad также показали возможность получения культуры клеток эндотелия от доноров, средний возраст которых превышал 75 лет, а средняя плотность эндотелиальных клеток составляла  $1943,75 \pm 222,02$  кл/мм<sup>2</sup>. В ходе культивирования авторы использовали ROCK-ингибиторы и принудительное приклеивание клеточных конгломератов с использованием вискоэластика [17].

## МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК

Все имеющиеся на сегодня методы выделения эндотелия роговицы можно разделить на 4 группы: механические, механические с использованием ферментов, ферментативные и основанные на органном культивировании.

При первом из указанных способов выделения эндотелий отделяется от десцеметовой мембраны механически с последующим переносом на культуральную поверхность. Неоспоримым преимуществом данного метода является получение гомогенной культуры клеток эндотелия роговицы. Однако культура, полученная данным способом, обладает очень низкой клеточной активностью, и большинство полученных клеток экспрессируют маркеры раннего апоптоза [20].

Ферментативный метод выделения подразумевает инкубирование корнеосклерального диска с раствором коллагеназы, диспазы, этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) или трипсина, что неизбежно приводит к получению гетерогенной клеточной культуры, содержащей примеси фибробластов стромы роговицы. Последующее применение селективных культуральных сред не дает ожидаемого получения гомогенной культуры клеток эндотелия роговицы [21–23].

Совместное применение механического и ферментативного методов обеспечивает более щадящее выделение клеток эндотелия роговицы, однако использование ферментов требует длительного вре-

Таблица

### Критерии отбора доноров для получения культуры клеток эндотелия роговицы

#### Donor selection criteria for corneal endothelial cell culture

Возраст донора	от 2 до 79 лет
Плотность эндотелиальных клеток	1800–3891 клеток/мм <sup>2</sup>
Среднее время от момента смерти до консервации роговицы	не более 12 часов
Среднее время от момента смерти до введения в эксперимент	не более 7 дней

мени инкубирования, что приводит к повышению клеточного повреждения [21–24].

К недостаткам метода органного культивирования десцеметовой мембраны с прилежащим слоем эндотелия относится получение гетерогенной культуры клеток вследствие присутствия нижележащих слоев стромы. Кроме того, культура, полученная данным методом, характеризуется крайне низкой митотической активностью [21].

## СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Сравнительный анализ базовых питательных сред для получения культуры клеток эндотелия роговицы был проведен G. Peh et al. [25]. В рамках данной работы были исследованы такие питательные среды, как DMEM [26]; OptiMEM [27]; DMEM/F12 [28]; Ham's F12/M199 [29]. Было показано, что при использовании DMEM и DMEM/F12 клеточная культура после второго пассажа утрачивает митотическую активность, клетки увеличиваются в размерах и подвергаются апоптозу. В свою очередь использование OptiMEM и Ham's F12/M199 способствует поддержанию культуры вплоть до 3-го пассажа с сохранением митотической активности и экспрессии специфических эпителиальных маркеров ZO-1 и Na/K АТФазы. Однако, несмотря на наличие типичной иммуноцитохимической картины, клетки утрачивают свою характерную морфологическую форму. Согласно Y. Zhu et al., данные изменения обусловлены наличием в составе питательных сред основного фактора роста фибробластов, что способствует стимуляции эпителиально-мезенхимального перехода [30].

На сегодня максимально эффективная схема ведения культуры эндотелиальных клеток роговицы подразумевает поэтапное использование различных питательных сред, так называемый «метод двух сред». В качестве первой выступает среда, содержащая базовую эндотелиальную бессывороточную среду Human Endothelial SFM, необходимую для стабилизации клеточной культуры и поддержания характерного фенотипа. Для активации пролиферативной активности клеток культуру помещают во

вторую среду на основе Ham's F12/M199. Использование данного подхода позволяет получить более гомогенную клеточную культуру с характерной морфологией и предотвратить возникновение эпителиально-мезенхимального перехода [31]. Несмотря на преимущества указанного метода, имеющиеся на сегодня доклинические и клинические испытания проводятся на основе применения сред DMEM/F12 [32] и OptiMEM [33].

## ДОБАВКИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Помимо выбора базовой питательной среды, крайне актуальным является подбор факторов, поддерживающих культуру клеток эндотелия роговицы. Сообщается, что такие факторы, как bFGF [35], LIF [36], EGF [36], NGF [37], добавка для роста эндотелиальных клеток [38] и 2-фосфат L-аскорбиновая кислота [39], способствуют росту эндотелия. Предполагается, что использование LIF задерживает контактное ингибирование и совместно с bFGF в бессывороточной среде способствует пролиферации клеток эндотелия с сохранением характерного фенотипа [35].

В литературе имеются данные о получении не-трансформируемой клеточной линии эндотелиальных клеток роговицы, доведенных до 224-го пассажа [39]. В данной работе для поддержания клеток использовали питательную среду на основе DMEM/F12 с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки, антибиотиков, основного фактора роста фибробластов (bFGF), эпидермального фактора роста (EGF), N-ацетилглюкозамина гидрохлорида, глюкозамина гидрохлорида, хондроитинсульфата, продуктов окисления и деградации хондроитинсульфата, карбоксиметилхитозана, бычьего экстракта глаза и культурального супернатанта клеток стромы роговицы человека в логарифмической фазе. Представленный результат, как заявляют авторы, был достигнут вследствие использования кондиционированной среды. Zhu et al. сообщили, что использование кондиционированной среды кератоцитов в логарифмической фазе роста стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток роговицы лучше, чем использование костномозговых мезенхимальных стволовых клеток МСК [40]. Представленные данные, возможно, показывают потенциал использования кондиционированных сред для стимулирования пролиферации эндотелиальных клеток роговицы.

Известен фармакологический подход к восстановлению эндотелия с использованием ингибитора Rho-ассоциированной киназы (ROCK) Y-27632 [41]. Использование ROCK при культивировании помогает регулировать форму и движение клеток, воздействуя на цитоскелет [42]. Было показано, что ROCK Y-27632 способствует лучшей адгезии клеток, ингибирует апоптоз, является нетоксичным и не вызывает

изменений морфологии эндотелия роговицы человека [43, 44]. ROCK был предложен как активное вещество для восстановления потери эндотелиальных клеток *in vivo* на животных моделях [8].

Ряд авторов заявляет о том, что использование низкомолекулярных ингибиторов RhoA и ROCK Y-27632 может ингибировать эпителиально-мезенхимальную трансформацию, которая, возможно, запускается вследствие разрушения межклеточных соединений во время культивирования и пассирования культуры [40].

Следовательно, необходимы дальнейшие исследования особенностей получения и долгосрочного культивирования эндотелиальных клеток с целью оптимизации и стандартизации условий их культивирования с подтверждением функциональных свойств для дальнейшей трансляции данных исследований в клиническую практику.

## ПОСЕВНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Очень важным фактором является исходная посевная концентрация клеток, необходимая для сохранения их гексагональной морфологии, а также экспрессии всех маркеров. В исследованиях было показано, что таковой является концентрация  $1 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> [45].

## СУБСТРАТ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

Помимо выбора надлежащего состава питательной среды еще одним нерешенным вопросом является выбор оптимальной культуральной поверхности [45]. Многие научные коллективы для получения 2D-клеточной культуры эндотелия роговицы используют такие покрытия, как коллаген I типа [46] и фибронектин [16], коллаген IV типа [48], хондроитинсульфат и ламинин [49], матригель [50] и смесь для покрытия FNC [27]. Стоит отметить, что использование коллагена IV типа, а также E-8 Ламинина – 511 [51] как компонентов десцеметовой мембраны роговицы представляется наилучшим решением для получения гомогенной клеточной культуры эндотелия роговицы [40]. Также хорошо зарекомендовал себя фиброин шелка. Так, было показано, что его использование может поддерживать рост эндотелиальных клеток роговицы с характерной морфологией и экспрессией специфических маркеров [52].

## 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ

Ряд авторов использует 3D-культивирование клеток эндотелия роговицы ввиду его неоспоримого преимущества с точки зрения введения культуры клеток в переднюю камеру глаза. Было показано, что

использование 3D-сфероидов позволяет сохранить экспрессию ZO-1 и Na/K АТФазы. Данный вариант культивирования способствует преодолению эпителиально-мезенхимальной трансформации [53, 54].

### КРИОКОНСЕРВАЦИЯ

Следует отметить, что клеточная культура эндотелия уникальна, а ее наработка – дорогостоящая процедура, в связи с чем важным направлением является предупреждение потери ценных культур клеток путем криоконсервации. Была показана возможность использования следующих сред для криоконсервации культуры клеток эндотелия: Opti-MEM + 10% ДМСО + 10% FBS; Cellbanker 2; Bambanker; KM Banker; Stem-Cellbanker; Bambanker hRM; ReproCryo DMSO Free RM. Среди них лишь использование Bambanker hRM, не содержащей ксенодобавок, соответствует требованиям надлежащей производственной практики GMP [55].

### ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК

Характеристика клеток является одним из основных моментов культивирования, включающих в себя как определение функциональных свойств культуры, так и подтверждение ее аутентичности. Изучение морфологии – самый простой и наиболее очевидный метод идентификации клеток.

Peh et al. [45] предложили использовать индекс округлости для оценки формы эндотелиальных клеток роговицы, чтобы отличить их от удлинённых фибробластов.

$$\text{Округлость} = \frac{4\pi \cdot \text{Площадь}}{\text{Периметр}^2},$$

где значение, стремящиеся к 1,0, указывает на округлую форму клеток.

В настоящее время основными стандартными процедурами идентификации культуры клеток являются методики изучения их генотипа, а также маркеров, специфичных для исследуемых клеток.

### ГЕНОТИП ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

Для оценки генотипа полученных *in vitro* эндотелиальных клеток роговицы используют ПЦР с обратной транскриптазой, изучая экспрессию мРНК. Следует отметить, что на сегодня отсутствует четкий набор исследуемых генов, необходимых для подтверждения эндотелиальной видоспецифичности клеток. Наиболее часто исследуемые гены в первичной клеточной культуре эндотелия роговицы человека – Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> АТФаза (ATPA1), ZO-1 (TJP1), коллаген 8-го типа (COL8) и семейство переносчиков (SLC4). Также единично сообщается об исследовании следующих генов: виментин, N-кадгерин, CD166, нестин, OCT 3/4, Snail, p27, a-SMA, Laminin [56–58].

### ФЕНОТИП ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

Для изучения фенотипа полученных *in vitro* эндотелиальных клеток роговицы в основном используют иммуноцитохимический метод окрашивания на следующие маркеры, встречающиеся почти во всех научных сообщениях: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> АТФаза, ZO-1, Ki67. Данные маркеры многие исследователи принимают за основные и характерные для эндотелиальных клеток роговиц человека [59]. Кроме того, определяют N- и E-кадгерин, Актин, CD 166, CD44, CD77, нестин, виментин, коллаген IV и VIII типа, цитокератин 3, a-SMA, GFAP.

### КЛИНИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ГОМОГЕННОСТИ КУЛЬТУРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

Первая клиническая панель CD-маркеров была предложена Kinoshita et al. [33]. В данном исследовании было показано, что эндотелиальные клетки, экспрессирующие CD166+ и не экспрессирующие CD44-, CD133-, CD105-, CD24-, CD26-, имеют неизменный генотип и фенотип и могут быть использованы для клеточной терапии. Отсутствие CD44, CD24 и CD26 свидетельствует об исключении анеуплоидных клеток, тем самым связывая фенотипический анализ с клеточным кариотипом [60, 61].

Стоит отметить ряд исследований, в которых сообщается, что функционирующие эндотелиальные клетки экспрессируют CD166, CD200, GPC4, HLA-ABC и PD-L1 [57, 62–64] и не экспрессируют a-SMA, CD9, CD24, CD26, CD44, CD73, CD90, CD105, CD133, SNAIL, ZEB1 и виментин [64–66].

### ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ НАРАБОТКИ В ПОЛУЧЕНИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

На сегодня процесс заготовки и трансплантации клеток заднего эпителия роговицы в Российской Федерации ограничен Федеральным законом № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах». Однако применение суспензии некультивированных клеток эндотелия роговицы является легитимным методом использования данных клеток и не вступает в противоречие с вышеуказанным Законом. По мнению ряда исследователей, трансплантация эндотелиальных клеток может рассматриваться как вариант селективной эндотелиальной кератопластики [24]. На сегодня в России проведено сравнение различных способов выделения эндотелиальных клеток в эксперименте *ex vivo*. Установлено, что выделение эндотелиальных клеток модифицированным энзимным методом является более эффективным и предпочтительным по сравнению с модифицированным механическим способом выделения: в результате проведенного анализа данных проточной цитофлуориметрии была

обнаружена статистически достоверная разница по количеству выделенных клеток и размеру частиц ( $p < 0,05$ ). При этом не было обнаружено статистически значимых отличий в жизнеспособности эндотелиальных клеток, выделенных модифицированным энзимным методом, по сравнению с модифицированным механическим способом. Авторами данного исследования показана фундаментальная и клиническая значимость разработки протоколов выделения эндотелиальных клеток [24].

## ПРИМЕНЕНИЕ IPS-КЛЕТОК

В 2006 году группа ученых из Киотского университета во главе с Takahashi и Yamanaka впервые получила индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS-клетки), которые были выделены из фибробластов путем эпигенетического перепрограммирования [67].

На сегодня продолжается разработка протоколов получения эпителиальных клеток роговицы из iPS-клеток. Так, в работе R.A. Martínez et al. проводится поиск оптимального момента культивирования для инициации дифференцировки iPS-клеток в фенотипы предшественников эпителия роговицы – лимбальные эпителиальные стволовые клетки [68]. На сегодня описан ряд протоколов по созданию клеток эпителия роговицы из iPS-клеток [69].

Ведутся исследования, направленные на получение кератоцитов из iPS-клеток. Так, известные протоколы описывают поэтапную схему получения кератоцитов, в которых предлагается синтезировать кератоциты через этап получения клеток нервного гребня для избегания трансформации iPS-клеток в фибробластоподобные [70].

Известно, что эндотелиальные клетки роговицы могут быть получены с применением iPS-методики из эмбриональных стволовых клеток [21, 66, 71–73] и стволовых клеток пуповиной крови [74].

## МОДЕЛИ ТЕСТИРОВАНИЯ НА ЖИВОТНЫХ

При моделировании трансплантации клеточной культуры эндотелиальных клеток роговицы необходимо тщательно подходить к выбору животной модели. Использование животных, относящихся к отряду грызунов или отряду зайцевых, не представляется возможным, так как у их представителей эндотелий роговицы способен к регенерации и пролиферации в отличие от эндотелиальных клеток роговицы человека [75]. Для эффективной оценки трансплантации эндотелиальных клеток возможно использование других животных моделей, таких как кошки [76], свиньи или приматы [77], поскольку имеют схожие морфофункциональные особенности между эндотелиальными клетками этих животных и человека. Однако стоит отметить, что использование таких животных связано с определенными сложнос-

тями как в дорогостоящих содержании и уходе, так и в получении всех разрешительных документов и этического одобрения.

## ПРИМЕНЕНИЕ В КЛИНИКЕ

На сегодня известны две работы по клиническому применению культивированных клеток эндотелия роговицы человека [32, 33]. Стоит отметить, что в обоих исследованиях были пролечены пациенты с буллезной кератопатией. Данные работы были подтверждены доклиническими исследованиями *in vivo*, а также на кадаверном глазу в модели *ex vivo*. В работе Kinoshita et al. клетки вводили посредством инъекции в совокупности с ингибитором ROCK в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл, в работе Parikumar et al. [32] использовали нанокompозитный гель в виде листка с культивированными клетками на его поверхности в концентрации  $5 \times 10^5$  кл/мл.

Однако исследователи не оценивали миграцию введенных клеток, что повлекло за собой большое количество споров об эффективности и конкретном вкладе клеточной культуры в получение положительных результатов. Также стоит отметить, что ни одна из групп не сообщила о побочных эффектах у пациентов. Kinoshita et al. заявили о теоретической возможности попадания клеточной культуры в трабекулярную сеть и развитию глаукомы, однако ни у одного из пациентов не было обнаружено данной патологии в течение двух лет наблюдения [33].

Также Kinoshita et al. опубликовали результаты пятилетнего наблюдения за 11 пациентами. Было показано восстановление прозрачности роговицы у 10 из 11 пациентов. При изучении итоговой плотности эндотелиальных клеток у 8 пациентов спустя 5 лет были получены показатели, равные  $1000$  клеткам/мм<sup>2</sup>, а у 2 –  $2000$  клеток/мм<sup>2</sup>. Толщина роговицы в центре у 10 из 11 пациентов в течение 5 лет вернулась к нормальным показателям (менее  $630$  мкм) [78].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Трансплантация культуры эндотелиальных клеток роговицы имеет потенциал кардинально изменить подход к лечению эндотелиальных патологий роговицы с возможностью быстрого восстановления зрения и уменьшения потребности в донорском материале. Результаты разных исследовательских групп показывают возможность использования трансплантации эндотелиальных клеток роговицы при лечении эндотелиальной патологии роговицы. Однако для применения в клинике данной технологии необходимо решить ряд вопросов, а именно оптимизировать протоколы выделения и культивирования клеточной культуры эндотелия роговицы. Кроме того, необходимо разработать экспериментальные методы, которые позволят отслеживать и картировать трансплантированные клетки, для оценки успешности клеточной

терапии. Также есть необходимость установления объективных методов оценки прозрачности роговицы. На данный момент принята макрофотосъемка с использованием щелевой лампы, однако интерпретация полученных изображений отличается субъективизмом и существенно варьирует у разных авторов.

Единственная опубликованная к настоящему моменту работа по пересадке эндотелиальных клеток человека выполнена Kinoshita et al. (2018). Она выполнена с использованием 8% фетальной бычьей сыворотки, используемой при культивировании эндотелиальных клеток. Однако наличие ксеногенных продуктов представляет собой существенное ограничение для дальнейшего массового использования клеточных продуктов. Стоит отметить, что на сегодня нет опубликованных данных по разработке протокола получения и культивирования эндотелиальных клеток без использования ксеногенных продуктов.

С нашей точки зрения, целесообразно рассмотреть прогрессивные методы применения клеточных культур, а именно 3D-сфероидов, так как введение клеточной суспензии не позволяет четко отследить точечное прикрепление клеток, а также оценить его эффективность. Использование биосовместимых носителей-подложек может технически усложнить проведение операций в клинике вследствие увеличения травматичности вмешательства, связанного с необходимостью проведения относительно большого операционного разреза по сравнению с таковым, необходимым для инъекции клеточной культуры. Кроме того, применение различных матриц, скорее всего, потребует их последующего удаления, а это, в свою очередь, может способствовать развитию побочных эффектов и осложнений. Таким образом, в аспекте вышеизложенного комплекс вопросов, связанный с трансплантацией клеток эндотелия роговицы, является крайне актуальным, но не до конца изученным и требующим дальнейшего углубленного исследования.

*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. Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H. The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Front Physiol.* 2017; 8: 371.
2. Hutcheon AEK, Zieske JD, Guo X. 3D *in vitro* model for human corneal endothelial cell maturation. *Exp Eye Res.* 2019; 184: 183–191. doi: 10.1016/j.exer.2019.04.003.
3. Yamamoto A, Tanaka H, Toda M, Sotozono C, Hamuro J, Kinoshita S et al. A physical biomarker of the quality of cultured corneal endothelial cells and of the long-term prognosis of corneal restoration in patients. *Nat Biomed Eng.* 2019; 3 (12): 953–960. doi: 10.1038/s41551-019-0429-9.
4. Robaei D, Watson S. Corneal blindness: a global problem. *Clin Exp Ophthalmol.* 2014; Apr; 42 (3): 213–214. doi: 10.1111/ceo.12330.
5. Малугин БЭ, Мороз ЗИ, Борзенко СА, Дроздов ИВ, Айба ЭЭ, Пахтаев АН. Первый опыт и клинические результаты задней автоматизированной послойной кератопластики (ЗАПК) с использованием предварительно выкроенных консервированных ультратонких роговичных трансплантатов. *Офтальмохирургия.* 2013; 3: 12–16. Malyugin BE, Moroz ZI, Borzenok SA, Drozdov IV, Ayba EE, Pashtaev AN. Pervyyu opyt i klinicheskie rezul'taty zadney avtomatizirovannoy posloynoy keratoplastiki (ZAPK) s ispol'zovaniem predvaritel'no vykroennykh konservirovannykh ul'tratonkikh rogovichnykh transplantatov. *Oftal'mokhirurgiya.* 2013; 3: 12–16.
6. Малугин БЭ, Шилова НФ, Антонова ОП, Анисимова НС, Шормаз ИН. Сравнительный анализ клинико-функциональных результатов задней послойной кератопластики с использованием фемтосекундного лазера и микрокератома. *Офтальмохирургия.* 2019; 1: 20–26. Malyugin BE, Shilova NF, Antonova OP, Anisimova NS, Shormaz IN. Sravnitel'nyu analiz kliniko-funktsional'nykh rezul'tatov zadney posloynoy keratoplastiki s ispol'zovaniem femtosekundnogo lazera i mikrokeratoma. *Oftal'mokhirurgiya.* 2019; 1: 20–26.
7. Малугин БЭ, Шилова НФ, Анисимова НС, Антонова ОП. Трансплантация эндотелия и десцеметовой мембраны. *Вестник офтальмологии.* 2019; 135 (1): 98–103. Malyugin BÉ, Shilova NF, Anisimova NS, Antonova OP. Transplantation of endothelium and Descemet's membrane. *Vestnik Oftalmologii.* 2019; 135 (1): 98–103. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma201913501198>.
8. Rajan MS. Surgical strategies to improve visual outcomes in corneal transplantation. [e-journal]. *Eye.* 2014; 28 (2): 196.
9. Калинин ЮЮ, Динь ТХА, Золотаревский АВ, Калинин СЮ. Новый хирургический подход к предесцеметовой эндотелиальной кератопластике (PDEK). *Вестник офтальмологии.* 2023; 139 (1): 55–66. Kalinnikov YuYu, Dinh THA, Zolotarevskiy AV, Kalinnikova SYu. A new surgical approach to pre-Descemet's endothelial keratoplasty. *Vestnik Oftalmologii.* 2023; 139 (1): 55–66. (In Russ., In Engl.). doi: 10.17116/oftalma202313901155.
10. Baydoun L, Tong CM, Tse WW. Endothelial cell density after Descemet membrane endothelial keratoplasty: 1 to 5-year follow-up. *Am J Ophthalmol.* 2012; 154: 762–763.
11. Tarantino-Scherrer JN, Kaufmann C, Bochmann F, Bachmann LM, Thiel MA. Visual recovery and endothelial cell survival after Descemet stripping automated endothelial keratoplasty for failed penetrating keratoplasty grafts: A cohort study. *Cornea.* 2015; 34: 1024–1029.

12. Eye Bank Assotiation of America (EBAА). Eye banking statistical report. Washington, D.C., 2019. 110 p.
13. Малугин БЭ, Борзенко СА, Комах ЮА, Арбуханова ПМ, Желтоножко АА, Сабурин ИИ и др. Современные возможности клеточных технологий в конструировании биологического эквивалента искусственной роговицы. *Бюллетень СО РАМН*. 2014; 34 (5): 43–47. Malyugin BE, Borzenok SA, Komakh YuA, Arbukhanova PM, Zheltonozhko AA, Saburina IN et al. Modern possibilities of cell technologies in biological equivalent of artificial cornea constructing. *Byulleten' SO RAMN*. 2014; 34 (5): 43–47.
14. Joyce NC, Navon SE, Roy S, Zieske JD. Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium *in situ*. [e-journal]. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37 (8): 1566.
15. Mannagh JJ, Irving A. Human corneal endothelium: Growth in tissue cultures. *Arch Ophthalmol*. 1965; 74: 847–849.
16. Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea*. 2004; 23: S8–S19.
17. Parekh M, Ahmad S, Ruzza A, Ferrari S. Human Corneal Endothelial Cell Cultivation From Old Donor Corneas With Forced Attachment. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 142. doi: 10.1038/s41598-017-00209-5.
18. Ронкина ТИ. Закономерности возрастных изменений эндотелия роговицы человека в норме и патологии, возможности активации пролиферации эндотелия и их значение в офтальмологии: дис. ... докт. мед. наук. М., 1994; 50. Ronkina TI. Zakonomernosti vozrastnykh izmenenij endoteliya rogovicy cheloveka v norme i patologii, vozmozhnosti aktivatsii proliferatsii endoteliya i ih znachenie v oftal'mologii. [Dissertation]. M., 1994; 50.
19. Явишева ТМ. Морфо-функциональные особенности эндотелия роговицы человека в норме и патологии и отбор донорского материала для кератопластики: дис. ... канд. мед. наук. М., 1990; 198. Yavisheva TM. Morfo-funkcional'nye osobennosti endoteliya rogovicy cheloveka v norme i patologii i otbor donorskogo materiala dlya keratoplastiki. [Dissertation]. M., 1990; 198.
20. Bartakova A, Kuzmenko O, Alvarez-Delfin K, Kunzevitzky NJ, Goldberg JL. A Cell Culture Approach to Optimized Human Corneal Endothelial Cell Function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018; 59 (3): 1617–1629. doi: 10.1167/iovs.17-23637.
21. Parekh M, Ferrari S, Sheridan C, Kaye S, Ahmad S. Concise Review: An Update on the Culture of Human Corneal Endothelial Cells for Transplantation. *Stem Cells Transl Med*. 2016; 5 (2): 258–264. doi: 10.5966/sectm.2015-0181.
22. Казанцев АД, Островский ДС, Борзенко СА. Результаты разработки протокола выделения и культивирования заднего эпителия роговицы человека. *Вестник Совета молодых ученых и специалистов Челябинской области*. 2017; 3 (4 (19)): 50–52. Kazantsev AD, Ostrovskiy DS, Borzenok SA. Experience of a new method of isolation and cultivation of human corneal endothelial cells *ex vivo*. *Vestnik Soveta molodykh uchenykh i spetsialistov Chelyabinskoy oblasti*. 2017; 3 (4 (19)): 50–52.
23. Казанцев АД, Островский ДС, Герасимов МЮ, Борзенко СА. Изучение экспериментальных методов выделения и культивирования клеток эндотелия роговицы человека. *Современные технологии в офтальмологии*. 2017; 4: 105–108. Kazantsev AD, Ostrovskiy DS, Gerasimov MYu, Borzenok SA. Izuchenie eksperimental'nykh metodov vydeleniya i kul'tivirovaniya kletok endoteliya rogovitsy cheloveka. *Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii*. 2017; 4: 105–108.
24. Малугин БЭ, Борзенко СА, Островский ДС, Антонова ОП, Хубецова МХ, Цикаришвили НР. Разработка метода получения суспензии эндотелиальных клеток роговицы человека и ее последующей трансплантации в эксперименте *ex vivo*. *Офтальмохирургия*. 2022; 4: 56–64. Malyugin BE, Borzenok SA, Ostrovskiy DS, Antonova OP, Hubetsova MH, Tsikarishvili NR. Development of a method for obtaining a suspension of human corneal endothelial cells and its subsequent transplantation in an *ex vivo* experiment. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2022; 4: 56–64. doi: 10.25276/0235-4160-2022-4-56-64.
25. Peh GS, Toh KP, Wu FY, Tan DT, Mehta JS. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS One*. 2011; 6 (12): e28310. doi: 10.1371/journal.pone.0028310.
26. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, Kinoshita S. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 800–806.
27. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 1743–1751.
28. Li W, Sabater AL, Chen YT, Hayashida Y, Chen SY, He H, Tseng SC. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48: 614–620.
29. Engelmann K, Friedl P. Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1989; 25: 1065–1072.
30. Zhu YT, Chen HC, Chen SY, Tseng SC. Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *J Cell Sci*. 2012; 125 (Pt 15): 3636–3648.
31. Peh GS, Chng Z, Ang HP, Cheng TY, Adnan K, Seah XY et al. Propagation of human corneal endothelial cells: a novel dual media approach. *Cell Transplant*. 2015; 24 (2): 287–304. doi: 10.3727/096368913X675719.
32. Parikumar P, Haraguchi K, Senthilkumar R. Human corneal endothelial cell transplantation using nanocomposite gel sheet in bullous keratopathy. *Am J Stem Cells*. 2018; 7 (1): 18–24.
33. 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; 995–1003.
34. Lee JG, Kay EP. FGF-2-mediated signal transduction during endothelial mesenchymal transformation in cor-

- neal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2006; 83 (6): 1309–1316.
35. Liu X, Tseng SC, Zhang MC, Chen SY, Tighe S, Lu WJ, Zhu YT. LIF-JAK1-STAT3 signaling delays contact inhibition of human corneal endothelial cells. *Cell Cycle.* 2015; 14 (8): 1197–1206. doi: 10.1080/15384101.2015.1013667.
  36. Zhu YT, Chen HC, Chen SY, Tseng SC. Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *J Cell Sci.* 2012; 125: 3636–3648.
  37. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium *ex vivo*: a morphologic study. *Cornea.* 2001; 20 (7): 731–737.
  38. Liu Y, Sun H, Hu M, Zhu M, Tighe S, Chen S et al. Human Corneal Endothelial Cells Expanded *In Vitro* Are a Powerful Resource for Tissue Engineering. *Int J Med Sci.* 2017; 14 (2): 128–135. doi: 10.7150/ijms.17624.
  39. Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M et al. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One.* 2012; 7 (1): e29677. doi: 10.1371/journal.pone.0029677.
  40. Zhu YT, Tighe S, Chen SL, John T, Kao WY, Tseng SC. Engineering of Human Corneal Endothelial Grafts. *Curr Ophthalmol Rep.* 2015; 3 (3): 207–217.
  41. Koizumi N, Okumura N, Ueno M. Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea.* 2013; 32 (8): 1167–1170. doi: 10.1097/ico.0b013e318285475d.
  42. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N. The Role of Rho Kinase Inhibitors in Corneal Endothelial Dysfunction. *Curr Pharm Des.* 2017; 23 (4): 660–666. doi: 10.2174/1381612822666161205110027.
  43. Galvis V, Tello A, Fuquen JP, Rodríguez-Barrientos CA, Grice JM. ROCK Inhibitor (Ripasudil) as Co-adjuvant After Descemetorhexis Without an Endothelial Graft. *Cornea.* 2017; 36 (12): e38–e40. doi: 10.1097/ICO.0000000000001381.
  44. Bi YL, Zhou Q, Du F, Wu MF, Xu GT, Sui GQ. Regulation of functional corneal endothelial cells isolated from sphere colonies by Rho associated protein kinase inhibitor. *Exp Ther Med.* 2013; 5: 433–437.
  45. Peh GS, Toh KP, Ang HP, Seah XY, George BL, Mehta JS. Optimization of human corneal endothelial cell culture: density dependency of successful cultures *in vitro*. *BMC Research Notes.* 2013; 6: 176.
  46. Островский ДС, Герасимов МЮ, Хубецова МХ, Казанцев АД, Борзенко СА. Культивирование клеток заднего эпителия роговицы человека с использованием биопокрытия коллагена I типа. *Гены и клетки.* 2019; 14 (S): 174. Ostrovskiy DS, Gerasimov MYu, Khubetsova MKh, Kazantsev AD, Borzenok SA. Kul'tivirovanie kletok zadnego epiteliya rogovitsy cheloveka s ispol'zovaniem biopokrytiya kollagena I tipa. *Geny i kletki.* 2019; 14 (S): 174.
  47. Малюгин БЭ, Борзенко СА, Сабурова ИИ, Репин ВС, Кошелева НВ, Колокольцова ТД и др. Разработка биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе пленочного матрикса из спидроина и культивированных клеток лимбальной зоны глазного яблока. *Офтальмохирургия.* 2013; 4: 89–97. Malyugin BE, Borzenok SA, Saburina IN, Repin VS, Kosheleva NV, Kolokol'tsova TD i dr. Razrabotka bioinzhenernoy konstruktsii iskusstvennoy rogovitsy na osnove plenochnogo matriksa iz spidroina i kul'tivirovannykh kletok limbal'noy zony glaznogo yabloka. *Oftal'mokhirurgiya.* 2013; 4: 89–97.
  48. Zhu YT, Hayashida Y, Kheirikhah A, He H, Chen SY, Tseng SC. Characterization and comparison of intercellular adherent junctions expressed by human corneal endothelial cells *in vivo* and *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49 (9): 3879–3886.
  49. Engelmann K, Böhnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29 (11): 1656–1662.
  50. Miyata K, Drake J, Osakabe Y, Hosokawa Y, Hwang D, Soya K et al. Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea.* 2001; 20 (1): 59–63.
  51. Okumura N, Kakutani K, Numata R, Nakahara M, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F et al. Laminin-511 and -521 enable efficient *in vitro* expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56 (5): 2933–2942.
  52. Vázquez N, Rodríguez-Barrientos CA, Aznar-Cervantes SD, Chacón M, Cenis JL, Riestra AC et al. Silk Fibroin Films for Corneal Endothelial Regeneration: Transplant in a Rabbit Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017; 58 (9): 3357–3365. doi: 10.1167/iov.17-21797.
  53. Audrey EK, Hutcheon James D, Xiaoqing G. 3D *In Vitro* Model for Human Corneal Endothelial Cell Maturation. *Exp Eye Res.* 2019; 184: 183–191.
  54. Островский ДС, Казанцев АД, Комах ЮА, Малюгин БЭ, Борзенко СА. Получение культуры клеток заднего эпителия роговицы человека для трансплантации. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2018; 20 (S1): 157. Ostrovskiy DS, Kazantsev AD, Komakh YuA, Malyugin BE, Borzenok SA. Poluchenie kul'tury kletok zadnego epiteliya rogovitsy cheloveka dlya transplantatsii. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2018; 20 (S1): 157.
  55. Okumura N, Kagami T, Watanabe K, Kadoya S, Sato M, Koizumi N. Feasibility of a cryopreservation of cultured human corneal endothelial cells. *PLoS One.* 2019; 14 (6): e0218431. doi: 10.1371/journal.pone.0218431.
  56. Chen Y, Huang K, Nakatsu MN, Xue Z, Deng SX, Fan G. Identification of novel molecular markers through transcriptomic analysis in human fetal and adult corneal endothelial cells. *Hum Mol Genet.* 2013; 22: 1271–1279.
  57. Dorfmueller S, Tan HC, Ngoh ZX, Toh KY, Peh G, Ang HP et al. Isolation of a recombinant antibody specific for a surface marker of the corneal endothelium by phage display. *Nat Publ Gr.* 2016; 6: 1–12.
  58. Bartakova A, Alvarez-Delfin K, Weisman AD, Salero E, Raffa GA, Merkhofer RM et al. Novel identity and functional markers for human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016; 57: 2749–2762.
  59. Казанцев АД, Островский ДС, Герасимов МЮ, Борзенко СА. Разработка протокола фенотипирования

- клеток заднего эпителия роговицы кадаверных глаз человека. *Современные технологии в офтальмологии*. 2018; 4: 158–162. Kazantsev AD, Ostrovskiy DS, Gerasimov MYu, Borzenok SA. Razrabotka protokola fenotipirovaniya kletok zadnego epiteliya rogovitsy kadavernoykh glaz cheloveka. *Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii*. 2018; 4: 158–162.
60. Hamuro J, Ueno M, Toda M, Sotozono C, Montoya M, Kinoshita S. Cultured human corneal endothelial cell aneuploidy dependence on the presence of heterogeneous subpopulations with distinct differentiation phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57: 4385–4392.
61. Toda M, Ueno M, Hiraga A, Asada K, Montoya M, Sotozono C et al. Production of homogeneous cultured human corneal endothelial cells indispensable for innovative cell therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017; 58: 2011–2020.
62. Cheong YK, Ngoh ZX, Peh GS, Ang HP, Seah XY, Chng Z et al. Identification of cell surface markers glypican-4 and CD200 that differentiate human corneal endothelium from stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54: 4538–4547.
63. Okumura N, Hirano H, Numata R, Nakahara M, Ueno M, Hamuro J et al. Cell surface markers of functional phenotypic corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55: 7610–7618.
64. Ueno M, Asada K, Toda M, Hiraga A, Montoya M, Sotozono C et al. Micro RNA profiles qualify phenotypic features of cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57: 5509.
65. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N et al. Concomitant evaluation of a panel of exosome proteins and MIRS for qualification of cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57: 4393–4402.
66. Wei Z, Batagov AO, Carter DRF, Krichevsky AM. Fetal bovine serum RNA interferes with the cell culture derived extracellular RNA. *Sci Rep*. 2016; 6: 31175.
67. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25; 126 (4): 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904174.
68. Martínez García de la Torre RA, Nieto-Nicolau N, Morales-Pastor A, Casaroli-Marano RP. Determination of the Culture Time Point to Induce Corneal Epithelial Differentiation in Induced Pluripotent Stem Cells. *Transplant Proc*. 2017; 49 (10): 2292–2295.
69. Chakrabarty K, Shetty R, Ghosh A. Corneal cell therapy: with iPSCs, it is no more a far-sight. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Oct 25; 9 (1): 287.
70. Naylor RW, McGhee CN, Cowan CA, Davidson AJ, Holm TM, Sherwin T. Derivation of Corneal Keratocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One*. 2016 Oct 28; 11 (10): e0165464.
71. Lee JB, Song JM, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kang SM et al. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2004; 128 (6): 727–735.
72. Chen P, Chen JZ, Shao CY, Li CY, Zhang YD, Lu WJ et al. Treatment with retinoic acid and lens epithelial cell-conditioned medium *in vitro* directed the differentiation of pluripotent stem cells towards corneal endothelial cell-like cells. *Exp Ther Med*. 2015; 9 (2): 351–360.
73. Zhang K, Pang K, Wu X. Isolation and transplantation of corneal endothelial cell-like cells derived from in-vitro-differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014; 23 (12): 1340–1354.
74. Joyce NC, Harris DL, Markov V, Zhang Z, Saitta B. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Mol Vis*. 2012; 18: 547–564.
75. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Araie M, Amano S. Comparison of rabbit corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46 (10): 3645–3648. doi: 10.1167/iovs.05-0630.
76. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977; 16 (7): 597–613.
77. Van Horn DL, Hyndiuk RA. Endothelial wound repair in primate cornea. *Exp Eye Res*. 1975; 21 (2): 113–124. doi: 10.1016/0014-4835(75)90076-7.
78. 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; 128 (4): 504–514. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.09.002.

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