

Переживаемость кератоцитов и эндотелиальных клеток заднего послойного трансплантата роговицы, культивированных в модифицированной консервационной среде

С.А. Борзенко, Б.Э. Малюгин, Д.С. Островский, А.К. Ахмедов, Х.Д. Тонаева, Ю.А. Комах, М.Х. Хубецова

ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Сравнить переживаемость кератоцитов и клеток заднего эпителия (эндотелия) донорской роговицы человека в усовершенствованной среде для хранения и оптимизации гидратации роговицы.

Материал и методы. Использованы 2D-клеточные культуры кератоцитов и эндотелиальных клеток роговицы, культивированных в модифицированной консервационной среде в течение 14 и 7 сут. соответственно. Для подтверждения характерного фенотипа клеток проведено иммуноцитохимическое исследование к следующим маркерам: для кератоцитов – Люмикан, Кератокан и α -гладкомышечный актин; для эндотелиальных клеток – ZO-1 и Na/K-АТФаза. Для детекции запуска апоптоза в клеточной культуре кератоцитов исследовали Цитохром С, BAX, а также Каспазы 3 и 8. Подтверждение жизнеспособности клеточных культур после культивирования проводили с использованием набора «Live and Dead». Морфологию эндотелиальных клеток изучали при помощи электронного сканирующего микроскопа.

Результаты. 2D-культура кератоцитов, культивируемая в исследуемой среде, экспрессировала характерные маркеры: Люмикан, Кератокан и не экспрессировала α -гладкомышечный актин. Маркер апоптоза в клеточной культуре кератоцитов спустя 14 сут. культивирования выявлено не было. При исследовании культуры эндотелия роговицы, культивируемой в течение 7 сут., выявлена экспрессия ZO-1 и Na/K-АТФазы, а также сохранение характерной гексагональной морфологии клеток по данным электронной микроскопии.

Заключение. Усовершенствованная среда для консервации роговицы обеспечивает сохранение уникального фенотипа кератоцитов, а также оказывает незначительное влияние на пролиферативную активность данных клеток в течение 14 суток. Среда сохраняет жизнеспособность и функциональную активность эндотелия роговицы как минимум до 7 суток культивирования.

Ключевые слова: клеточная культура, эндотелий роговицы, кератоциты, задний послойный трансплантат роговицы, среда для хранения роговицы ■

ABSTRACT

Survival of the posterior lamellar cornea graft keratocytes and endothelial cells cultivated in the modified corneal preservation media

S.A. Borzenok, B.E. Malyugin, D.S. Ostrovskiy, A.K. Ahmedov, Kh.D. Tonaeva, Yu.A. Komakh, M.K. Khubetsova

Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow

Purpose. To study the survival of keratocytes and endothelial cells of a human donor cornea storage in the standard and the new media which was specifically designed for optimized cornea hydration.

Material and methods. 2D cell cultures of keratocytes and endothelial cells obtained from the Eye tissue bank were used for culture in improved storage media over a period of 14 and 7 days subsequently. To confirm phenotype characteristics, the cells were stained by the following markers: for keratocytes – Lumikan, Keratocan, and α -smooth muscle actin; for endothelial cells – ZO-1 and Na/K-ATPase. The onset of

apoptosis in cell culture of keratocytes were detected with Cytochrome C, BAX, and Caspase 3 and 8. Viability of cell cultures after the cultivation was carried out using a commercial set of «Live and Dead». Morphology of the endothelial cells was assessed using an electron scanning microscope.

Results. It was shown that the 2D keratocyte culture cultured in the improved storage media expressed specific markers: Lumikan, Keratocan, and did not express α -smooth muscle actin. There were no markers of apoptosis in the cell culture of keratocytes after 14 days of cultivation. Corneal endothelium cultured in the improved storage media expresses



ZO-1, Na/K-ATPase and presented hexagonal cell shape morphology according to electron microscopy.

Conclusion. The improved storage media allow to preserve the unique phenotype of keratocytes, with a slight decrease in proliferative

cells activity during 14 days. The media maintain a viable and functional corneal endothelium for at least seven days of cultivation.

Key words: cell culture; corneal endothelium; keratocyte; posterior lamellar graft, corneal storage media ■

АКТУАЛЬНОСТЬ

Начиная примерно с 2000 г. в клиническую практику начинает активно внедряться техника эндотелиальной кератопластики, используемая для послойной замены пораженных задних слоев роговицы [1]. К настоящему времени предложено несколько модификаций эндотелиальной кератопластики, одна из которых – задняя автоматизированная послойная кератопластика (ЗАПК или DSAEK), получила наибольшее распространение в клинике для лечения больных с патологией эндотелия роговицы различного генеза [2–4]. Значительное количество усилий исследователей было направлено на разработку и внедрение технологий получения ультратонкого (менее 120–130 мкм) трансплантата как обеспечивающего более высокие зрительные функции по сравнению со стандартными трансплантатами, имеющими большую толщину.

Известен факт посмертной гипергидратации донорских роговиц, находящихся в стандартных консервационных средах, что не позволяет получать оптимальную толщину трансплантата с использованием техники одинарного прохода микрокератома. Однако до настоящего времени как в России, так и за рубежом отсутствуют консервационные среды, обеспечивающие оптимальную степень содержания влаги в донорской роговице. В связи с этим нами разработана оригинальная рецептура среды, служащая для дегидратации донорских роговиц на этапе консервации [5]. В ранее проведенных исследованиях установлен факт более оптимальной гидра-

тации трупной донорской роговицы, хранившейся в предложенной среде [6]. Однако вопросы переживаемости кератоцитов и клеток заднего эпителия роговицы, консервированной в данной среде, ранее не изучались.

ЦЕЛЬ

Сравнить переживаемость кератоцитов и клеток заднего эпителия (эндотелия) донорской роговицы человека в усовершенствованной среде для её оптимальной гидратации перед выкраиванием ультратонкого заднего послойного трансплантата методом одинарного прохода микрокератома.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Получение клеточных культур 2D-культура кератоцитов

Культура кератоцитов получена из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Культирование кератоцитов проводили в двух опытных группах: контрольная группа – культивирование в стандартной культуральной бессывороточной среде (DMEM/F12 («Sigma Aldrich», США), Фактор роста фибробластов – 10 нг/мл («ПанЭко», Россия), эпителиальный фактор роста – 5 нг/мл («ПанЭко», Россия), L-аскорбиновая кислота – 10 нг/мл («Sigma aldrich», США), 1% раствор антибиотиков («ThermoFisher scientific», США), L-глутамин – 2 мМ («ThermoFisher scientific», США)). В экспериментальной группе использовали оригинальную среду для

консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы [5]. Для изучения воздействия на кератоциты использовали 2D-клеточную культуру 3 пассажа. Посевная концентрация кератоцитов составила 4,2·10⁴ клеток в 1 мл, культивирование проводили в чашках Петри 60 мм (SPL, Южная Корея), при стандартных условиях (37 °С, 5% CO₂), срок культивирования – 14 сут., смена среды каждые 3 сут.

Эндотелий роговицы

Для изучения переживаемости эндотелия роговицы в культуральных растворах использовали 5 пар корнеосклеральных дисков из Глазного тканевого банка ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Средний возраст доноров составил 43±7 лет, время от момента смерти до начала эксперимента не превышало 18 ч.

Полученные корнеосклеральные диски очищали от переднего эпителия, используя офтальмологический скарификатор. Далее диски переносили в культуральные флаконы, с добавлением 15 мл питательной среды: контрольная группа – DMEM/F12 («Sigma aldrich», США), фетальная бычья сыворотка – 2% («ThermoFisher scientific», США), раствор антибиотиков – 1% («ThermoFisher scientific», США), L-глутамин – 2 мМ («ThermoFisher scientific», США); экспериментальная группа – оригинальная среда. Культивирование проводили при стан-

Для корреспонденции:

Островский Дмитрий Сергеевич,
к.б.н., научный сотрудник
ORCID ID: 0000-0002-2817-7102
E-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

дартных условиях (37 °С, 5% CO₂), срок культивирования составил 7 сут., смена среды каждые 3 сут.

Иммуноцитологическое исследование клеточных культур

Для подтверждения клеточного фенотипа кератоцитов и эндотелия роговицы проводили иммуноцитохимический анализ: для кератоцитов изучали специфические маркеры – Кератокан (sc-66941; «Santa Cruz», США), Люмикан (ab-168348; «Abcam», Великобритания), для эндотелия роговицы – ZO-1 (ab-221546; «Abcam», Великобритания) и Na/K АТФазу (sc-48345; «Santa Cruz», США). Кроме того, оценивали экспрессию α-гладкомышечного актина (ab-7817; «Abcam», Великобритания), данный маркер является неспецифичным для кератоцитов, но его обнаружение в культуре свидетельствует о переходе кератоцитов в миофибробласты. Также в 2D-культуре кератоцитов оценивали апоптоз: для определения активации каспазного пути апоптоза изучали Каспазы 3 (ab-44976; «Abcam», Великобритания) и 8 (ab-32397; «Abcam», Великобритания), для активации митохондриального пути апоптоза изучали Цитохром С (ab-110325; «Abcam», Великобритания) и ВАХ (ab-81083; «Abcam», Великобритания).

Спустя 14 сут. культивирования кератоцитов и 7 сут. культивирования корнеосклеральных дисков проводили их фиксацию в 10% нейтральном формалине (рН=7,0) в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего трехкратно отмывали в растворе PBS («ПанЭко», Россия). Далее 2D-культуру кератоцитов и корнеосклеральные диски обрабатывали 0,25% раствором Triton X-100 («ThermoFisher scientific», США) в течение 20 мин при комнатной температуре, с последующим трехкратным промыванием PBS. Инкубирование с первичными антителами проводили в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре с последующим трехкратным промыванием PBS. Затем проводили инкубирование с вторичными антителами

Alexa Fluor 488 (ab150113; «Abcam», Великобритания) и Alexa Fluor 594 (ab 150080; «Abcam», Великобритания) в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре. Ядра клеток контрастировали Hoechst 33258 (ab 228550; «Abcam», Великобритания) в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Изучение образцов проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus Fluoview FV 10i («Olympus», Япония).

Изучение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность кератоцитов оценивали на проточном цитофлуориметре CytoFlex («Beckman Coulter», США) используя флуоресцентный краситель Live and Dead (ab 115347; «Abcam», Великобритания) по протоколу, заявленному производителем. Определение индекса пролиферации проводили в автоматическом счетчике клеток Luna II («Logos Biosystems», Южная Корея) по стандартному протоколу.

Для определения жизнеспособности эндотелиальных клеток роговицы так же использовали флуоресцентный краситель Live and Dead, с последующим изучением препаратов на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus Fluoview FV 10i («Olympus», Япония).

Морфологическая оценка эндотелия роговицы

Морфологическую оценку и подсчет количества клеток проводили на растровом сканирующем электроном микроскопе JSM-6000 PLUS («Jeol», Япония) после соответствующей подготовки. Образцы после культивирования промывали трехкратно раствором PBS, далее проводили дегидратацию с использованием раствора ацетона в восходящей концентрации (10, 20, 30, 50, 70, 90, 100x3) по 30 мин. Сушка в критической точке проводилась в парах CO₂ при возрастающем давлении до 1250 psi при 37 °С в течение 120 мин на приборе Quorum EMS 850 («Quorum», Великобритания).

Для обеспечения электронно-проходящего слоя дегидратированные образцы помещали на предметные столики для электронной микроскопии с последующим напылением золотом (толщина слоя 5 нм) с использованием Smart Coater («Jeol», Япония). Далее образцы располагали в камеру сканирующего электронного микроскопа, анализ осуществляли в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили, используя методы описательной статистики с помощью программного обеспечения Graph Pad Software Prisma 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Качественная оценка роста и фенотипа 2D-культуры кератоцитов

Морфология кератоцитов в исследуемых группах была представлена схожими биполярными мезенхимоподобными клетками (рис. 1).

При оценке пролиферации отметили слабую пролиферативную активность кератоцитов в обеих исследуемых группах в течение всего срока культивирования. Коэффициент пролиферации в экспериментальной группе составил 12,63%, в контрольной группе – 13,86%. Количество делящихся кератоцитов в обеих группах в разные сроки культивирования представлены в таблице 1. При сравнительном анализе кривой изменения количества клеток статистической разницы между группами выявлено не было, что может свидетельствовать об отсутствии у исследуемых составов сред стимуляции к пролиферации.

При изучении жизнеспособности кератоцитов в течение всего срока культивирования с использованием флуоресцентного красителя Live and Dead было выявлено отсутствие статистической разницы между группами (табл. 2).

Иммуноцитохимическое окрашивание показало, что кератоциты активно экспрессируют Кератокан и Люмикан и не экспрессируют специфический маркер миофибробластов – α -гладкомышечный актин (рис. 2).

В обеих группах выявили отсутствие экспрессии маркеров раннего апоптоза каспазного пути (Каспазы 3 и 8), а также митохондриального пути – Цитохрома С и ВАХ (рис. 3).

Полученные результаты показали, что новое средство для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы является нетоксичным и способствует сохранению уникального фенотипа кератоцитов.

Качественная оценка роста и фенотипа эндотелия роговицы

В обеих исследуемых группах спустя 7 сут. культивирования отмечали потерю плотности клеток эндотелия, которая между группами была статистически недостоверной (табл. 3).

При детекции живых и мертвых клеток флуоресцентным красителем значительных различий между группами также выявлено не было (табл. 4). Следует отметить, что потеря клеток в обеих группах не превышала 8%.

Иммуноцитохимическое окрашивание спустя 7 сут. культивирования показало наличие функциональных маркеров эндотелия ZO-1 и Na/KAT-Фазы (рис. 4). Клеток, не экспрессирующих данные маркеры, в обеих группах, обнаружено не было.

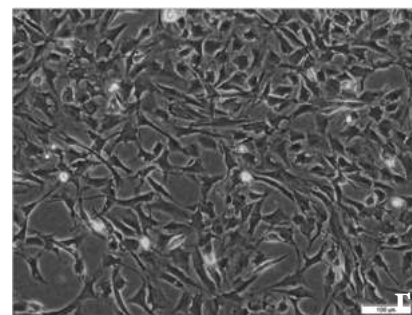
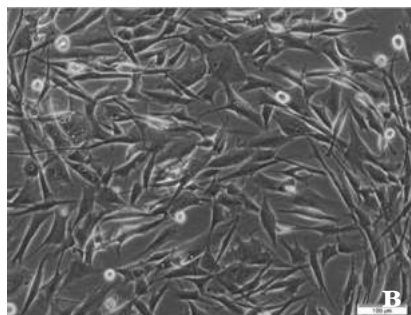
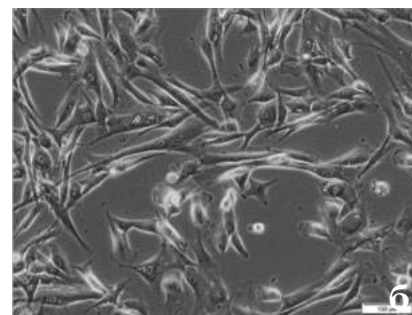
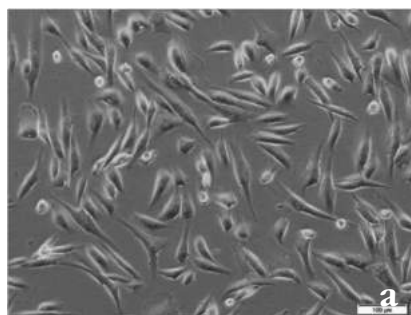


Рис. 1. Морфологическая картина клеточной культуры кератоцитов: а) 3-и сутки, контрольная группа; б) 3-и сутки, экспериментальная группа; в) 14-е сутки, контрольная группа; г) 14-е сутки, экспериментальная группа Световая фазово-контрастная микроскопия, ув. 100.

Fig. 1. Morphological picture of the cell culture of keratocytes: а) 3rd day, the control group; б) 3rd day, the experimental group; в) 14th days, control group; г) 14th day, the experimental group. Light phase contrast microscopy, magnification - 100x

При анализе морфологии клеток эндотелия роговицы на 7-е сутки культивирования с использованием электронной сканирующей микроскопии выявили клетки характерной гексагональной формы, а также группы клеток, утративших целостность клеточной мембраны и с ярко выраженным клеточным ядром, свидетельствующим об их нежизнеспособности (рис. 5).

Полученные результаты показали, что разработанная среда для консервации заднего послойного транс-

плантата донорской роговицы способствует сохранению жизнеспособного и функционального эндотелия роговицы как минимум до 7 дней культивирования.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время ведется множество работ, направленных на получение ультратонкого трансплантата для задней послойной кератопластики, поскольку доказано, что

Таблица 1

Динамика изменения количества кератоцитов по группам, тыс. клеток

Table 1

The dynamic changes of the keratocyte numbers in groups, thousand cells

Группа / Study groups	1-е сутки 1st day	4-е сутки 4th day	7-е сутки 7th day	10-е сутки 10th day	14-е сутки 14th day
Контрольная / Control	300,0 ± 2,6	305,9 ± 1,8	312,5 ± 4,8	325,8 ± 12,8	337,9 ± 14,8
Экспериментальная / Experimental	300,0 ± 2,8	308,7 ± 2,3	315,9 ± 5,3	331,7 ± 11,9	341,5 ± 13,6

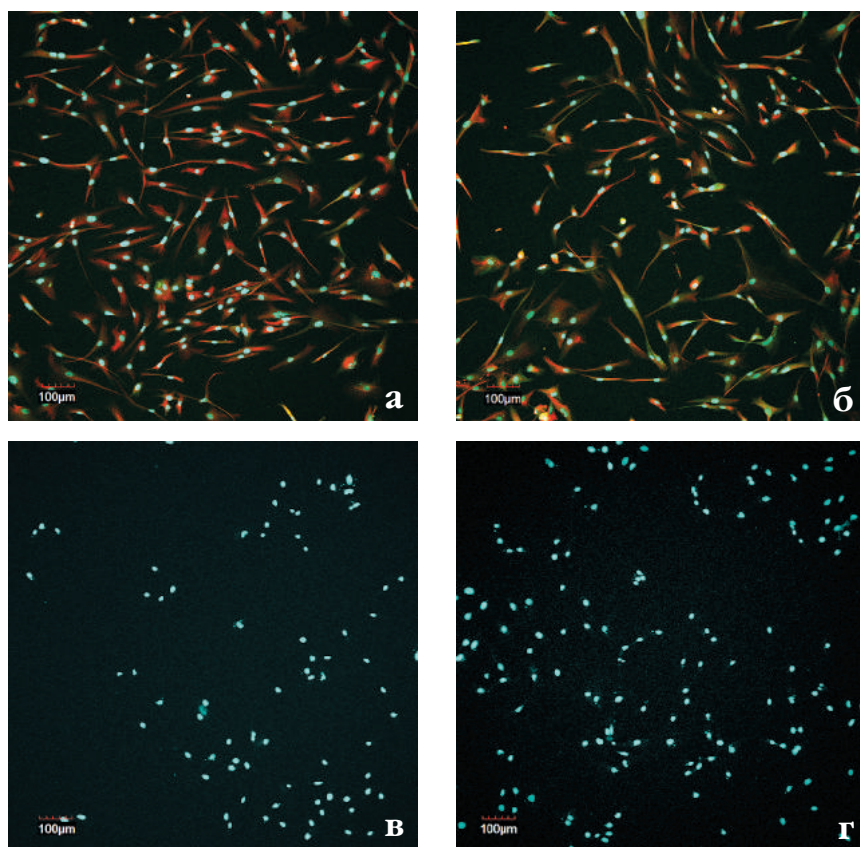


Рис. 2. Иммуноцитохимическая картина культуры кератоцитов: а, б) экспрессия Кератокана (красный цвет) и Люмикана (зеленый цвет); в, г) экспрессия α -гладкомышечного актина (зеленый цвет); а), в) контрольная группа; б), г) экспериментальная группа. Иммуноцитохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ядра контрастированы бис-бензимидами (Hoechst 33258), ув. 100

Fig. 2. Immunocytochemical picture of the culture of keratocytes: а, в) expression of Keratocan (red color) and Lumikan (green color); в, г) expression of α -smooth muscle actin (green color); а), в) control group, б), г) experimental group. Immunocytochemical staining, laser scanning confocal microscopy, nuclei contrasted with bis-benzimide (Hoechst 33258), magnification – 100x

минимизация количества остаточной стромы на трансплантате способствует значительному повышению зрительных функций в послеоперационном периоде [7, 8].

На сегодня существует несколько методик получения ультратонкого трансплантата задних слоев роговицы, включающих в себя технику двойного реза микрокератомом,

использование лазера, а также методику предварительной дегидратации донорской роговицы путем ее помещения в специальные среды.

Применение техники двойного реза микрокератомом способствует получению более равномерного трансплантата толщиной около 100 мкм [9]. Однако данная методика имеет высокий риск перфорации донорской роговицы. Кроме того, в проведенных исследованиях было показано, что отношение нежизнеспособных клеток эндотелия донорской роговицы к общему количеству эндотелиальных клеток в группе двойного реза составило 0,0145, а в группе с одним резом – 0,0028. Таким образом, проведение дополнительного реза донорской роговицы приводит к статистически значимому более высокому количеству поврежденных нежизнеспособных эндотелиальных клеток [10].

Применение лазеров (преимущественно фемтосекундных) для выкраивания трансплантата задних слоев роговицы приобретает все большую популярность ввиду простоты методики и возможности получения равномерного трансплантата заданной толщины. Однако данная методика характеризуется более высокой потерей эндотелиальных клеток по сравнению с применением микрокератомом [11]. Стоит отметить, что применение фемтосекундного лазера сопровождается вторичным индуцированным УФ-излучением, приводящему к излишнему накоплению перекисных радикалов в тканях. Эти радикалы оказывают повреждающее действие на клеточные

Таблица 2

Соотношение живых/мертвых кератоцитов, %

Table 2

The ratio of live/dead keratocytes, %

Группа / Study groups	1-е сутки 1st day	4-е сутки 4th day	7-е сутки 7th day	10-е сутки 10th day	14-е сутки 14th day
Контрольная/ Control	98/2	94,3/5,7	93,5/6,5	92,7/7,3	91,5/8,5
Экспериментальная/ Experimental	97/3	93,6/6,4	93/7	92,5/7,5	91,8/8,2

(кератоциты, эндотелиоциты) и тканевые структуры стромы роговицы, что может провоцировать избыточную асептическую воспалительную регенеративную реакцию [12]

Другим направлением получения ультратонких трансплантатов является предварительная дегидратация донорской роговицы непосредственно перед выкраиванием. Данная методика предполагает дополнительные манипуляции с переносом донорской роговицы в отдельную ёмкость со специальным раствором, что повышает риск контаминации донорского материала [13].

В настоящее время нет ни одной научной работы, в которой проводится изучение апоптоза, а также изучаются хромосомные повреждения в кератоцитах и эндотелии донорских роговиц, хранившихся в различных консервационных средах перед выкраиванием с помощью традиционных методов (механический кератом, фемтосекундный лазер). Такие исследования представляют несомненный научный и практический интерес.

Модифицированная среда для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы [5] была сконструирована на основе ранее зарекомендовавшей себя среды Борзенка–Мороз [14], которая в 2010 г. получила официальное разрешение к применению на территории Российской Федерации и является табульной для гипотермической консервации сквозных трансплантатов трупных донорских роговиц. Особенность среды Борзенка–Мороз в отличие от зарубежных

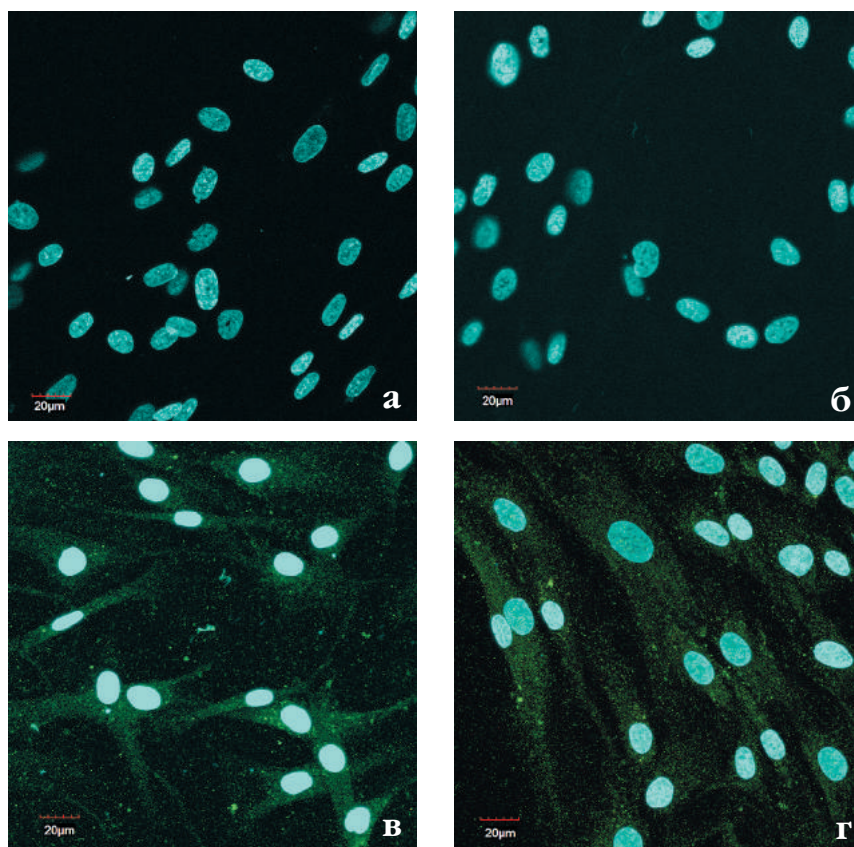


Рис. 3. Иммуноцитохимическая картина культуры кератоцитов: а), б) экспрессия цитохрома С (красный цвет) и ВАХ (зеленый цвет); в), г) экспрессия Каспазы 8 (зеленый цвет) и Каспазы 3 (красный цвет); а), в) контрольная группа; б), г) экспериментальная группа. Иммуноцитохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ядра контрастированы бис-бензими́д (Hoechst 33258), ув. 100

Fig. 3. Immunocytochemical picture of the culture of keratocytes: а), б) expression of cytochrome C (red color) and BAX (green color); в), г) expression of Caspase 8 (green color) and Caspase 3 (carse color); а), в) control group; б), г) experimental group. Immunocytochemical staining, laser scanning confocal microscopy, nuclei contrasted with bis-benzimide (Hoechst 33258), magnification – 100x

аналогов (Optisol, Eusol) состоит в том, что авторами был подобран аминокислотный состав характерный для водянистой влаги глаза. Настоящая среда, предложенная нами,

отличается от среды Борзенка–Мороз наличием в составе лекарственного средства Фосфоглив, представляющего из себя группу физиологически активных фосфолипидов. Та-

Таблица 3

Динамика изменения количества клеток эндотелия по группам, клеток на мм²

Table 3

Dynamics of changes in the number of endothelial cells by groups, cells per mm²

Группа/ Study groups	1-е сутки 1st day	4-е сутки 4th day	7-е сутки 7th day
Контрольная / Control	2650±239	2510±280	2430±320
Экспериментальная / Experimental	2710±220	2590±250	2490±220

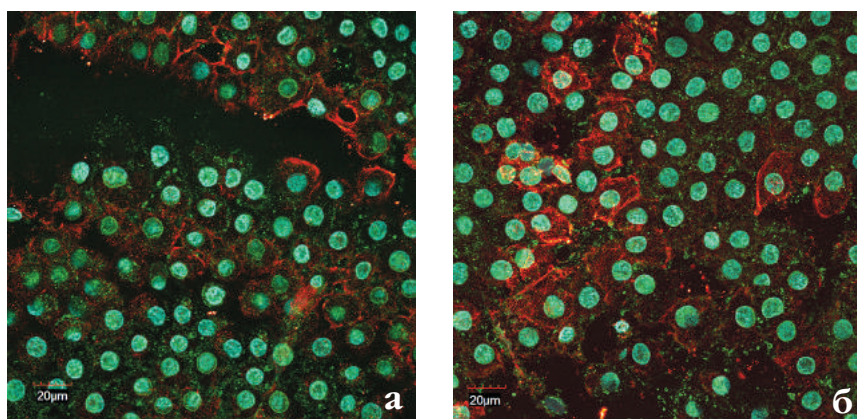


Рис. 4. Иммуноцитохимическая картина клеток эндотелия роговицы: экспрессия Na/K АТФазы (красный цвет), ZO-1 (зеленый цвет); а) контрольная группа; б) экспериментальная группа. Иммуноцитохимическое окрашивание, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ядра контрастированы бис-бензими́д (Hoechst 33258), ув. 100

Fig. 4. Immunocytochemical picture of corneal endothelial cells: Na / K ATPase expression (red color), ZO-1 (green color); a) control group; b) experimental group. Immunocytochemical staining, laser scanning confocal microscopy, nuclei contrasted with bis-benzimide (Hoechst 33258), magnification – 100x

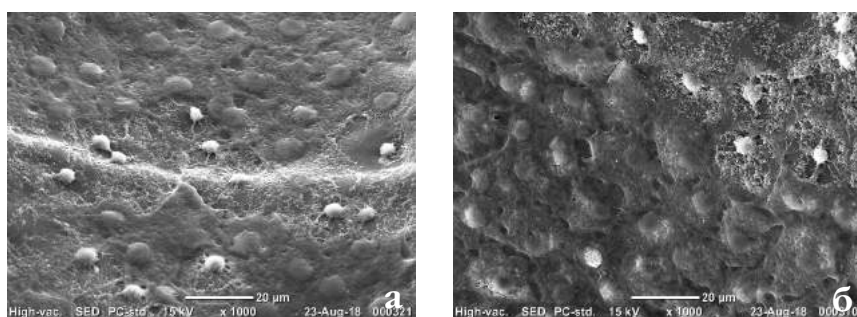


Рис. 5. Морфологическая картина клеток эндотелия роговицы на 7-е сутки культивирования: а) контрольная группа; б) экспериментальная группа; Электронная сканирующая микроскопия, высокий вакуум, ускоряющее напряжение 15 kV, ув. 1000

Fig. 5. Morphological picture of corneal endothelial cells on the 7th day of cultivation: a) control group; b) experimental group. Scanning electron microscopy, high vacuum, accelerating voltage 15 kV. Magnification – 1000x

ким образом, в процессе консервации роговицы достигается восстановление липидного слоя мем-

бран эндотелиальных клеток, способствующее повышению устойчивости к стрессовому воздействию, в

том числе при механическом выкраивании ультратонкого трансплантата и, собственно, задней послойной трансплантации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований доказано, что модифицированная среда для консервации заднего послойного трансплантата донорской роговицы [5] не только способствует оптимальной дегидратации стромы роговицы, что было показано в ранее проведенном исследовании [6], но также является нетоксичной. Среда обеспечивает жизнеспособность и функциональность эндотелия роговицы как минимум до 7 сут. консервации. Она сохраняет уникальный фенотип кератоцитов, оказывая незначительное влияние на их пролиферативную активность. Исследования показали перспективность и целесообразность дальнейших шагов по внедрению новой среды в практику работы глазных банков с её дальнейшей клинической оценкой.

Вклад авторов в работу:

С.А. Борзенко: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, редактирование, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации.

Б.Э. Малюгин: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, редактирование, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации.

Д.С. Островский: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и обработка материала, написание текста.

А.К. Ахмедов: сбор, анализ и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста.

Х.Д. Тонаева: сбор, анализ и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста.

Ю.А. Комах: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, редактирование.

М.Х. Хубецова: сбор, анализ и обработка материала, написание текста.

Соотношение живых/мертвых клеток эндотелия роговицы, %

Таблица 4

The ratio of living / dead cells of the corneal endothelium, %

Table 4

Группа / Study groups	1-е сутки 1st day	4-е сутки 4th day	7-е сутки 7th day
Контрольная / Control	99/1	95/5	90/10
Экспериментальная / Experimental	99/1	96/4	91/9

Author's contribution:

S.A. Borzenok: substantial contribution to concept and design of the work, editing, final approval of the version to be published.

B.E. Malyugin: substantial contribution to concept and design work, editing, final approval of the version to be published.

D.S. Ostrovskiy: a significant contribution to the conception and design of the work, acquisition, analysis and processing of the material, writing the text.

A.K. Ahmedov: collection, analysis and processing, statistical processing of data, writing the text.

H.D. Toneva: collection, analysis and processing, statistical processing of data, writing the text.

Yu.A. Komakh: substantial contribution to conception and design work, editing.

M.H. Khubetsova: collection, analysis and processing of the material, writing the text.

Финансирование: Авторы не получили конкретный грант на это исследование от какого-либо финансирующего агентства в государственном, коммерческом и некоммерческом секторах.

Авторство: Все авторы подтверждают, что они соответствуют действующим критериям авторства ICMJE. **Согласие пациента на публикацию:** Письменного согласия на публикацию этого материала получено не было. Он не содержит никакой личной идентифицирующей информации.

Конфликт интересов: Отсутствует.

ORCID ID: Ostrovskiy D.S. 0000-0002-2817-7102

Funding: The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Authorship: All authors confirm that they meet the current ICMJE authorship criteria.

Patient consent for publication: No written consent was obtained for the publication of this material. It does not contain any personally identifying information.

Conflict of interest: There is no conflict of interest.

ORCID ID: Ostrovskiy D.S. 0000-0002-2817-7102

2. Мамиконян В.Р., Труфанов С.В. Автоматизированная задняя послойная кератопластика в лечении буллезной кератопатии. Бюллетень СО РАМН. 2009;138(4): 37–39. [Mamikonyan VR, Trufanov SV. Avtomatizirovannaya zadnyaya posloynnaya keratoplastika v lechenii bulleznoy keratopatii. The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences. 2009;138(4): 37–39. (In Russ.)]

3. Малюгин Б.Э., Мороз З.И., Борзенко С.А., Дроздов И.В., Айба Э.Э., Паштаев А.Н. Первый опыт и клинические результаты задней автоматизированной послойной кератопластики (ЗАПК) с использованием предварительно выкросенных консервированных ультратонких роговичных трансплантатов. Офтальмохирургия. 2013;3: 12–16. [Malyugin BE, Moroz ZI, Borzenok SA, Drozdov IV, Aiba EE, Pashtaev AN. First experience and clinical results of DSAEK utilizing the pre-cut ultrathin grafts. Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery. 2013;3: 12–16. (In Russ.)]

4. Оганесян О.Г. Система хирургической реабилитации пациентов с эндотелиальной патологией роговицы: дис. ... докт. мед. наук. М.; 2011. [Oganesyanyan OG. The system of surgical rehabilitation of patients with corneal endothelial pathology [Dissertation]. M.; 2011.]

5. Патент РФ на изобретение № 2676311C1 / 27.12.2018. Борзенко С.А., Малюгин Б.Э., Тонаева Х.Д., Ахмедов А.К., Керимов Т.З., Комах Ю.А., Белодедова А.В., Литвинов А.В. Средство консервации заднего послойного трансплантата роговицы. Доступно по: <https://patenton.ru/patent/RU2676311C1> [Ссылка активна на 19.05.2021]. [Patent RUS № 2676311C1. Borzenok SA, Malyugin BE, Tonaeva HD, Ahmedov AK, Kerimov TZ, Komakh YuA, Belodedova AV, Litvinov AV. A means of preserving a posterior layered corneal graft Available from: <https://patenton.ru/patent/RU2676311C1> [Accessed 19th May 2021] (In Russ.)]

6. Тонаева Х.Д., Ахмедов А.К., Комах Ю.А., Малюгин Б.Э., Борзенко С.А. Результаты разработки консервационной среды для предоперационной подготовки ультра тонкого трансплантата роговицы. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2018;20: 165. [Tonaeva HD, Ahmedov AK, Komakh YuA, Malyugin BE, Borzenok SA. Results of the development of a conservational environment for preoperative preparation of an ultrathin corneal graft. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2018;20: 165. (In Russ.)]

7. Travella J, Shah V, Davidson R. Ultrathin DSAEK. Int Ophthalmol. 2013;53(2): 21–30. doi: 10.1097/IIO.0b013e31827823a8

8. Turnbull J, Tsatsos M, Hossain PN, Anderson DF. Determinants of visual quality after endothelial keratoplasty. Surv Ophthalmol. 2016;61: 257–271. doi: 10.1016/j.survophthal.2015.12.006

9. Werner L, Wilbanks G, Nieuwendaal C. Localized opacification of hydrophilic acrylic intraocular lenses after procedures using intracameral injection of air or gas. J Cataract Refract Surg. 2015;41(1): 199–207.

10. Waite A, Davidson R, Taravella MJ. DSAEK Donor tissue preparation using a double pass microkeratome technique. J Cataract Refract Surg. 2013;39(3): 446–450. doi: 10.1016/j.jcrs.2012.10.048

11. Vignola R, Giurgola L, Colabelli Gisoldi RAM, Gaudio M, D'Amato Tóthová J, Pocobelli A. Monitoring the microbial contamination of donor cornea during all preservation phases: a prospective study in the Eye Bank of Rome. Transp Infect Dis. 2019;21(2): 13041. doi: 10.1111/tid.13041

12. Lubatschowski H, Kermani O, Otten C, Yaller A, Schmiedt KC, Ertmer W. ArF-excimer laser-induced secondary radiation in photoablation of biological tissue. Lasers Surg Med. 1994;14(2): 168–177.

13. Малюгин Б.Э., Шилова Н.Ф., Антонова О.П., Анисимова Н.С., Шормаз И.Н. Сравнительный анализ клинко-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. Clinical and functional results following femtosecond laser-assisted DSEK versus microkeratome-assisted DSAEK surgeries. A comparative study. Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery. 2019;1: 20–26. (In Russ.) doi: 10.25276/0235-4160-2019-1-20-26

14. Патент РФ на изобретение № 2069951 C1 / 26.02.1993. Федоров С.Н., Мороз З.И., Борзенко С.А., Комах Ю.А. Среда для консервации роговицы глаза. [Patent RUS № 2069951 C1 / 26.02.1993. Fedorov SN, Moroz ZI, Borzenok SA, Komakh JuA. Medium for eye cornea conservation. (In Russ.)]

Поступила: 04.01.2021
Переработана: 12.03.2021
Принята к печати: 13.05.2021

Originally received: 04.01.2021
Final revision: 12.03.2021
Accepted: 13.05.2021

ЛИТЕРАТУРА

1. Terry MA. Endothelial keratoplasty: history, current state, and future, directions. Cornea. 2006;25(8): 873–878. doi: 10.1097/01.icc.0000244869.54761.50