

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ EXPERIMENTAL STUDIES IN OPHTHALMOLOGY

Научная статья

УДК 617.7

doi: 10.25276/0235-4160-2023-4-86-92

Трансплантация суспензии эндотелиальных клеток в эксперименте *ex vivo*

Б.Э. Малюгин^{1, 2}, С.А. Борзенко^{1, 2}, О.П. Антонова¹, Д.С. Островский¹, З.Р. Эбзеева¹

¹НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва

²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва

РЕФЕРАТ

Актуальность. Единственным вариантом лечения пациентов с патологией эндотелиального слоя роговицы остается выполнение трансплантации роговицы с заменой всей роговицы или ее патологически измененных слоев. В последние два десятилетия внедряется в клиническую практику методика селективной замены эндотелия, а именно задняя послойная кератопластика, которая имеет преимущества перед сквозной кератопластикой. Дальнейшие усовершенствования этого метода привели к созданию методики, при которой трансплантируется изолированная Десцеметова мембрана с монослоем эндотелия без стромального слоя роговицы донора. Однако данная технология сопряжена с рисками развития интра- и послеоперационных осложнений, а также является технически сложно исполнимой. На сегодня ведутся разработки по внедрению технологии трансплантации эндотелиальных клеток (ЭК) роговицы без стромального слоя и даже без Десцеметовой мембраны. Трансплантация ЭК в виде суспензии имеет потенциал изменить подход к лечению эндотелиальных патологий роговицы с возможностью быстрого восстановления зрения и уменьшения потребности в донорском материале. **Цель.** Оценить эффективность трансплантации суспензии ЭК на кадаверном глазу в эксперименте *ex vivo*. **Материал и методы.** Для проведения эксперимента предварительно получали суспензию ЭК

роговицы модифицированным энзимным методом. Эксперимент по трансплантации суспензии ЭК разделили на 3 этапа. На первом этапе проводили расчет потери ЭК в зависимости от способа введения клеток. На втором этапе в качестве реципиента для полученной суспензии был использован корнеосклеральный диск. Третий этап проводили на кадаверном глазном яблоке. **Результаты.** В данном эксперименте нами подтверждена жизнеспособность трансплантированных ЭК и факт их эффективной адгезии к Десцеметовой мембране. По истечении одной недели культивирования методом иммуногистохимического анализа в образцах роговицы были определены характерные маркеры ЭК ZO-1, Na⁺/K⁺-АТФаза, Ki67, а также обнаружены единичные клетки, экспрессирующие виментин. **Заключение.** По результатам эксперимента по трансплантации суспензии ЭК можно отметить перспективность данной методики в хирургической реабилитации пациентов с дисфункцией роговичного эндотелия. Таким образом, представляется актуальным выполнение дальнейших экспериментальных исследований по достижению основной цели – полноценному заполнению дефекта центральной зоны задней поверхности роговицы изолированными ЭК при условии сохранения их морфологии и функциональной активности.

Ключевые слова: роговица, эндотелиальная дистрофия роговицы, суспензия эндотелиальных клеток, трансплантация эндотелиальных клеток роговицы ■

Для цитирования: Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Антонова О.П., Островский Д.С., Эбзеева З.Р. Трансплантация суспензии эндотелиальных клеток в эксперименте *ex vivo*. Офтальмохирургия. 2023;4: 86–92. doi: 10.25276/0235-4160-2023-4-86-92

Автор, ответственный за переписку: Дмитрий Сергеевич Островский, dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

ABSTRACT

Original article

Transplantation of endothelial cell suspension in an *ex vivo* experiment

B.E. Malyugin^{1, 2}, S.A. Borzenok^{1, 2}, O.P. Antonova¹, D.S. Ostrovskiy¹, Z.R. Ebzeeva¹

¹S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

²A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Relevance. Corneal transplantation with entire cornea or anormal layers replacement remains the only treatment option for patients with corneal endothelium pathology. Selective endothelial replacement was

introduced into practice two decades ago, namely posterior lamellar keratoplasty, which has advantages over penetrating keratoplasty. Improvements of this method led to technique creation where isolated

Descemet's membrane with endothelium monolayer without stromal layer is transplanted. This technology is associated with risks of intra- and postoperative complications, and is difficult to perform. Nowadays, development is in progress of introducing corneal endothelial cells (CECs) transplantation without stromal layer and even without Descemet's membrane. CECs transplantation in suspension form has potential to change treatment approach of corneal endothelium pathologies giving possibility of rapid eyesight recovery and reducing need for graft material. **Purpose.** To evaluate effectiveness of corneal CECs suspension transplantation on cadaver eye in *ex vivo* experiment. **Material and methods.** CECs suspension was obtained by modified enzymatic method. CECs transplantation experiment consisted of 3 stages. Firstly, CECs loss was calculated depending on cell administration method. Secondly, corneoscleral button was used as recipient for the obtained suspension.

The third stage was carried out on cadaver eyeball. **Results.** The viability of transplanted CECs and their effective adhesion to Descemet's membrane was confirmed in this experiment. The characteristic markers of CECs ZO-1, Na⁺/K⁺-ATPase, Ki67 were determined in corneal samples by immunohistochemistry assay and single cells expressing Vimentin were detected after one-week cultivation. **Conclusion.** Based on transplantation experiment results, it can be noted this technique is quite promising in surgical rehabilitation of patients with corneal endothelial dysfunction. Thus, it seems relevant to continue research to achieve the main goal – to fully cover the defect of central zone of corneal posterior surface with isolated CECs given that their morphology and functional activity are preserved.

Key words: cornea, endothelial corneal dystrophy, endothelial cell suspension, corneal endothelial cell transplantation ■

For citation: Malyugin B.E., Borzenok S.A., Antonova O.P., Ostrovskii D.S., Ebezeva Z.R. Transplantation of endothelial cell suspension in an *ex vivo* experiment. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2023;4: 86–92. doi: 10.25276/0235-4160-2023-4-86-92

Corresponding author: Dmitrii S. Ostrovskii, dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

АКТУАЛЬНОСТЬ

Патологии эндотелиального слоя роговицы различного генеза, включая как первичную генетически детерминированную эндотелиальную дистрофию роговицы Фукса, так и вторичную буллезную кератопатию, являются одними из наиболее часто встречающихся и требуют проведения оптической кератопластики [1]. Единственный эффективный вариант лечения таких пациентов – это выполнение трансплантации роговицы с полной или частичной заменой ее слоев на донорскую ткань. В практике офтальмохирургов у пациентов с эндотелиальной недостаточностью роговицы преобладает метод сквозной кератопластики. Однако в последние два десятилетия активно внедрялась в клиническую практику более патогенетически обоснованная методика селективной замены эндотелия – задняя послойная кератопластика (ЗПК) [2].

В ходе ЗПК у реципиента удаляется дефектный монослой эндотелия с подлежащей Десцеметовой мембраной (ДМ), после чего на подготовленное ложе укладывается предварительно выкроенный донорский трансплантат, состоящий из нескольких слоев: стромы роговицы, ДМ и монослоя эндотелиальных клеток (ЭК) [3]. Толщина заднего послойного трансплантата может варьировать в широких пределах, но в среднем составляет 120 мкм. Данная технология имеет массу преимуществ в сравнении со сквозной кератопластикой. Одним из главных является исключение необходимости проведения операции по типу «открытого неба», когда глазное яблоко реципиента полностью разгерметизировано, соответственно, минимизируется вероятность сопряженных с этим операционных осложнений. Также при ЗПК трансплантируется меньшее количество донорской тка-

ни, что, в свою очередь, снижает риск развития реакции отторжения.

Дальнейшие разработки метода ЗПК привели к ее усовершенствованию и созданию метода эндотелиальной кератопластики ЭК, при которой трансплантируется изолированная ДМ с монослоем эндотелия без стромального слоя роговицы донора (ТЭДМ) [4]. Метод ТЭДМ имеет ряд существенных преимуществ в сравнении с ЗПК, а именно: трансплантируется меньший объем донорской ткани, получается более предсказуемый оптический результат по причине минимального влияния трансплантата (толщина порядка 20 мкм) на послеоперационную рефракцию, улучшаются оптические свойства зоны интерфейса (между подлежащей стромой реципиента и адаптированной трансплантированной ДМ донора). Несмотря на высокую технологичность и результативность метода ТЭДМ, она несет ряд специфических интра- и послеоперационных осложнений: высокая вероятность повреждения ДМ в ходе заготовки трансплантата (при отсепаровке от стромы роговицы донора), скручивание мембраны в передней камере глаза реципиента после имплантации, возможность инверсной фиксации трансплантата (эндотелием к строме реципиента), отслойка мембраны в послеоперационном периоде [5].

В связи с вышесказанным существуют предпосылки для дальнейшего усовершенствования эндотелиальной кератопластики, при этом одним из путей является трансплантация суспензии ЭК непосредственно в переднюю камеру глаза реципиента. В случае культивирования ЭК донора имеется потенциал существенного увеличения пула клеток, пригодных для трансплантации. Это даст возможность использования одного донора на несколько пациентов. Данный факт может стать решением проблемы дефицита донорского материала, при-

годного для проведения эндотелиальной кератопластики. Еще одним преимуществом технологии прямой инъекции ЭК реципиенту является возможность использования доноров с исходно низкой плотностью эндотелиальных клеток не пригодных для целей трансплантации. Подобный донорский материал чаще всего отбраковывается, однако он может быть использован для реабилитации пациентов с дисфункцией эндотелия при условии разработки эффективной технологии имплантации суспензии ЭК.

К настоящему моменту опубликованы лишь две работы по клиническому применению культивированных клеток эндотелия роговицы человека [6, 7]. Стоит отметить, что данным методом были пролечены пациенты с буллезной кератопатией. Указанные работы базировались на серии доклинических исследований, а также на экспериментах с кадаверными глазами (модель *ex vivo*). S. Kinoshita и соавт. вводили клетки посредством инъекции в совокупности с ингибитором ROCK-киназы в концентрации 1×10^6 кл/мл. В то время как P. Parikumar и соавт. использовали нанокompозитный гель в виде листка с культивированными клетками на его поверхности в концентрации 5×10^5 кл/мл. Однако в данных исследованиях не была детально изучена миграция 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 каких-либо побочных эффектах у своих пациентов. S. Kinoshita и соавт. заявили о теоретической возможности попадания клеточной культуры в трабекулярную сеть и развития глаукомы. Следует, однако, подчеркнуть, что ни у одного из пациентов не было обнаружено данного осложнения на протяжении двух лет наблюдения.

На данный момент на территории Российской Федерации использование культивированных клеточных продуктов регламентируется Федеральным законом № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах», что ограничивает использование полученных зарубежными коллективами результатов [8]. Также стоит отметить, что в данных работах применяется 8% фетальная бычья сыворотка, используемая для культивирования эндотелиальных клеток. Наличие ксеногенных продуктов представляет собой существенное ограничение для дальнейшего массового использования клеточных технологий. Стоит отметить, что на сегодня нет данных по разработке протокола получения и культивирования ЭК без использования ксеногенных продуктов. Однако применение суспензии нативных (некультивированных) клеток эндотелия роговицы позволяет легитимно использовать данный метод, не входя в противоречие с действующим законодательством. Данный вид трансплантации может рассматриваться как один из вариантов селективной эндотелиальной кератопластики [9].

Таким образом, в аспекте вышеизложенного комплекс вопросов, связанный с трансплантацией нативных кле-

ток эндотелия роговицы в современных условиях на территории Российской Федерации, является крайне актуальным, но не изученным. Трансплантация ЭК роговицы в виде их суспензии имеет потенциал кардинально изменить подход к лечению эндотелиальных патологий роговицы с возможностью быстрого восстановления зрения и уменьшения потребности в донорском материале.

ЦЕЛЬ

Оценить эффективность трансплантации суспензии ЭК на кадаверном глазу человека в эксперименте *ex vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ранее нами было опубликовано описание нескольких вариантов методики выделения ЭК и получения их суспензии [10].

Модифицированный энзимный метод выполняли путем предварительного выкраивания изолированной ДМ с эндотелием из кадаверной роговицы человека. ДМ переносили в пробирку типа Эппендорф, добавляли 0,3 мл трипсина (Invitrogen, США) и помещали в термощейкер: 300 rpm, при 37°C в течение 5 мин. Инактивация проводилась 10-кратным разбавлением полученной суспензии консервационной средой для хранения роговицы («Раствор для хранения роговицы», ООО НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) с последующим центрифугированием 5 мин, 900 об/мин при 37°C .

Эксперимент по трансплантации суспензии ЭК был разделен на 3 этапа.

На первом этапе нами был проведен подсчет планируемой потери ЭК, связанной с процедурой введения суспензии клеток «реципиенту» при использовании стеклянной канюли. Для этого было подготовлено 3 пробирки Эппендорф, содержащих 10×10^4 эндотелиальных клеток в 100 мкл среды для хранения роговицы, полученную суспензию однократно набирали в стеклянную канюлю с последующим переносом в чашку Петри для подсчета количества «трансплантированных» клеток в автоматизированном счетчике клеток Luna-II (Logos Biosystems, Южная Корея).

На втором этапе, в качестве модели реципиента для введения полученной суспензии использовали корнеосклеральный диск. Диск помещали в вакуумный трепан для донорских роговиц эндотелием вверх, предварительно до этапа удаления эндотелиальных клеток производили окрашивание роговицы раствором трипанового синего 0,15% (Membrane blue-Dual, DORC, Нидерланды) (рис. 1 а). Далее при помощи микротупфера механически и ирригационным методом – путем смыва струей сбалансированного солевого раствора (BSS) проводили деликатную зачистку эндотелия, при этом стараясь не повредить подлежащую ДМ (рис. 1 б). Диаметр зоны удаления

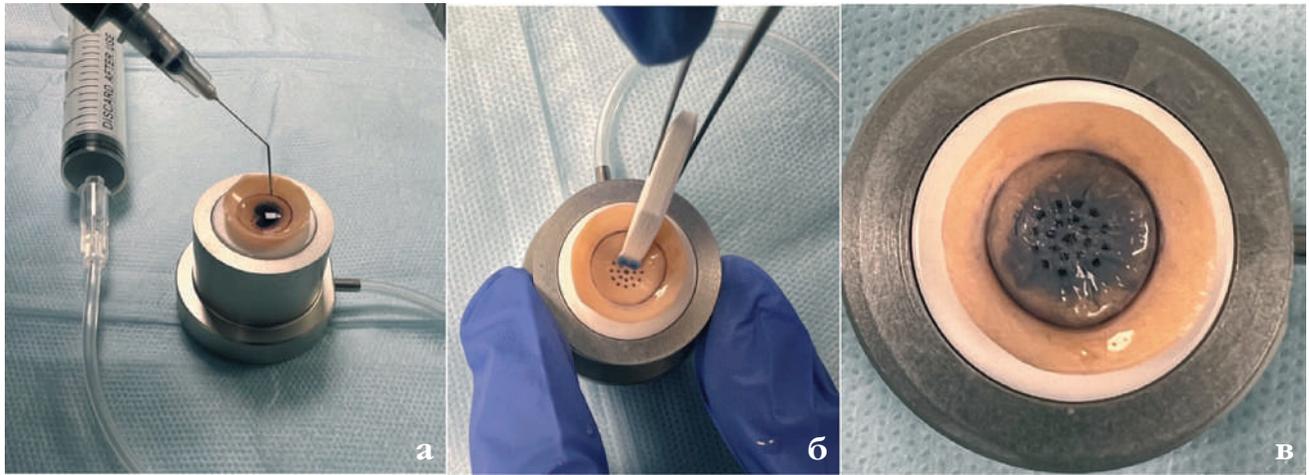


Рис. 1. Подготовка корneosклерального диска к инстиляции суспензии эндотелиальных клеток: а) окрашивание роговицы раствором трипанового синего; б) удаление эндотелиальных клеток при помощи микротупфера; в) дополнительное окрашивание после удаления эндотелиальных клеток с поверхности Десцеметовой мембраны

Fig. 1. Preparation of the corneoscleral disc for instillation of a suspension of endothelial cells: а) staining of the cornea with trypan blue solution; б) removal of endothelial cells using a microtupfer; в) additional staining after removal of endothelial cells from the surface of Descemet's membrane

эндотелиального монослоя составил 6 мм. Дополнительное окрашивание зоны воздействия проводили после удаления клеток с целью оценки полноты зачистки ДМ от эндотелиального монослоя (рис. 1 в).

Далее предварительно полученную суспензию в объеме 0,1 мл при помощи шприца объемом 1 мл, соединенного со стеклянной канюлей, наносили на корneosклеральный диск (рис. 2 а). При этом весь объем суспензии клеток концентрировался в носике стеклянной канюли (рис. 2 б), что позволило наиболее эффективно произвести трансплантацию клеток с минимальным объемом жидкости. Использование стеклянной канюли обосновано гладкостью ее стенок и минимальной вероятностью механического повреждения клеток в момент прохождения суспензии по просвету канюли. Имея физиологический изгиб, диск являлся резервуаром для инстиллированной суспензии, при этом максимальная концентрация клеток суспензии должна сосредотачиваться в центральной точке роговицы. Таким образом, имитируется положение пациента после проведенного хирургического вмешательства по трансплантации суспензии эндотелия «лицом вниз».

Далее корneosклеральный диск помещали в инкубатор при температуре 37 °С и 100% влажности на 4 ч, по-

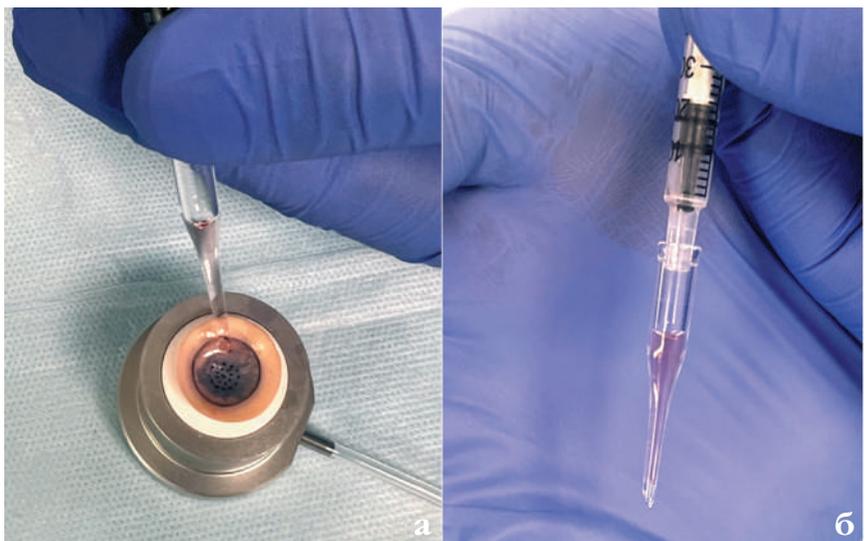


Рис. 2. Введение суспензии эндотелиальных клеток на модель реципиента: а) инстиляция суспензии на корneosклеральный кадаверный диск человека; б) суспензия эндотелиальных клеток объемом 0,1 мл в носике

Fig. 2. Introduction of endothelial cell suspension on the human corneoscleral cadaveric disk; б) endothelial cell suspension of 0.1 ml in the spout of a glass cannula

сле чего проводили оценку количества прикрепившихся эндотелиальных клеток к ДМ. Для этого суспензию забирали с задней поверхности роговицы и пересчитывали количество клеток в автоматизированном счетчике клеток Luna-II (Logos Biosystems, Южная Корея).

Третий этап эксперимента проводили на кадаверном глазном яблоке. Предварительно устанавливали донор-



Рис. 3. Глазное яблоко в инкубаторе, расположенное роговицей вниз, после имплантации суспензии эндотелиальных клеток

Fig. 3. Eyeball in the incubator positioned cornea downward after implantation of endothelial cell suspension

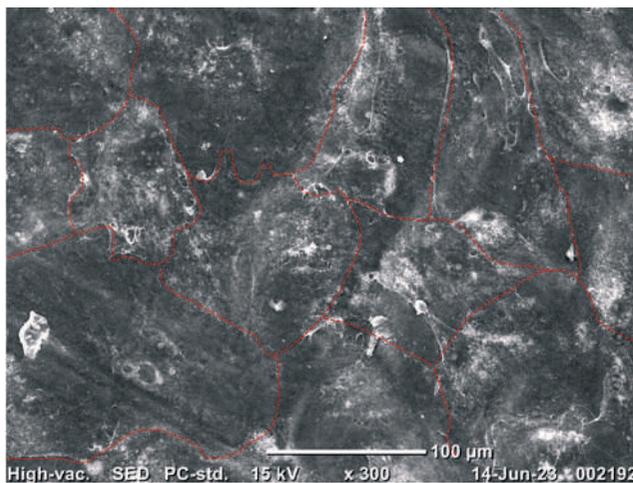


Рис. 4. Сканирующая электронная микроскопия кадаверной роговицы на 2-м этапе эксперимента. Ув. 300х, красными линиями выделены границы клеток, отмечается полное покрытие клетками ДМ

Fig. 4. Scanning electron microscopy of cadaveric cornea at the 2nd stage of the experiment. Eq. 300x, red lines mark cell boundaries, complete coverage of DM cells is noted

ский глаз в держатель. После дезэпителизации при помощи роговичного метчика определяли центральную зону диаметром 6 мм. Далее при помощи металлического ножа шириной 2,2 мм выполняли роговичный разрез, после чего при помощи модифицированного обратного крючка Сински зачищали заднюю поверхность ДМ. Саму ДМ при этом старались не травмировать и не получить ее разрывов или отслойки. После чего в переднюю камеру глаза вводили раствор трипанового синего с це-

лю оценки эффективности удаления ЭК с поверхности мембраны. При этом получали насыщенное окрашивание центральной зоны роговицы по намеченному диаметру 6 мм. Насыщенное окрашивание ДМ свидетельствует об отсутствии эндотелиальных клеток в данной зоне. Далее при помощи инсулинового шприца и стеклянной канюли трансплантировали 0,1 мл суспензии в переднюю камеру кадаверного глаза. Хирургический шва (нейлон 10-0). Глазное яблоко в перевернутом виде помещали в инкубатор при температуре 37 °С и 100% влажности на 4 ч для прикрепления трансплантированных ЭК к ДМ (рис. 3). После чего роговичным трепаном диаметром 16 мм иссекали корнеосклеральный диск для органотипического культивирования с целью определения регенеративной способности к закрытию сформированного дефекта на ДМ, а также оценки сохранности фенотипа трансплантированных клеток. Срок культивирования составил 3 суток, в культуральной среде, содержащей DMEM/F12, 2% – бычьей фетальной сыворотки, ингибитор Rho-киназы (ROCK), антибиотик и антимикотик. После культивирования были проведены сканирующая электронная микроскопия и иммуногистохимическое исследование.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе нами изучен процент потери ЭК в суспензии при прохождении через стеклянную канюлю. Для этого подсчитывали количество ЭК в готовой суспензии до прохождения через канюлю и после. Потеря ЭК составила $10 \pm 2,5\%$

По результатам второго этапа эксперимента показано, что количество клеток в суспензии, забранной с поверхности корнеосклерального диска, составило около $40 \pm 3,8\%$ от исходно введенного. Таким образом, через 4 ч после введения количество адгезированных к ДМ ЭК составляет около $60 \pm 12\%$ от первично введенного в суспензии.

По завершении третьего этапа эксперимента методом сканирующей электронной микроскопии нами подтверждена жизнеспособность трансплантированных ЭК, а также факт их эффективной адгезии к ДМ (рис. 4). По истечении 1-й недели культивирования методом иммуногистохимического анализа в образцах роговицы были определены характерные маркеры ЭК ZO-1, Na⁺/K⁺-АТФаза, Ki67, а также обнаружены единичные клетки, экспрессирующие виментин – маркер мезенхимальных клеток (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенного нами эксперимента итоговая потеря трансплантированных в суспензии ЭК

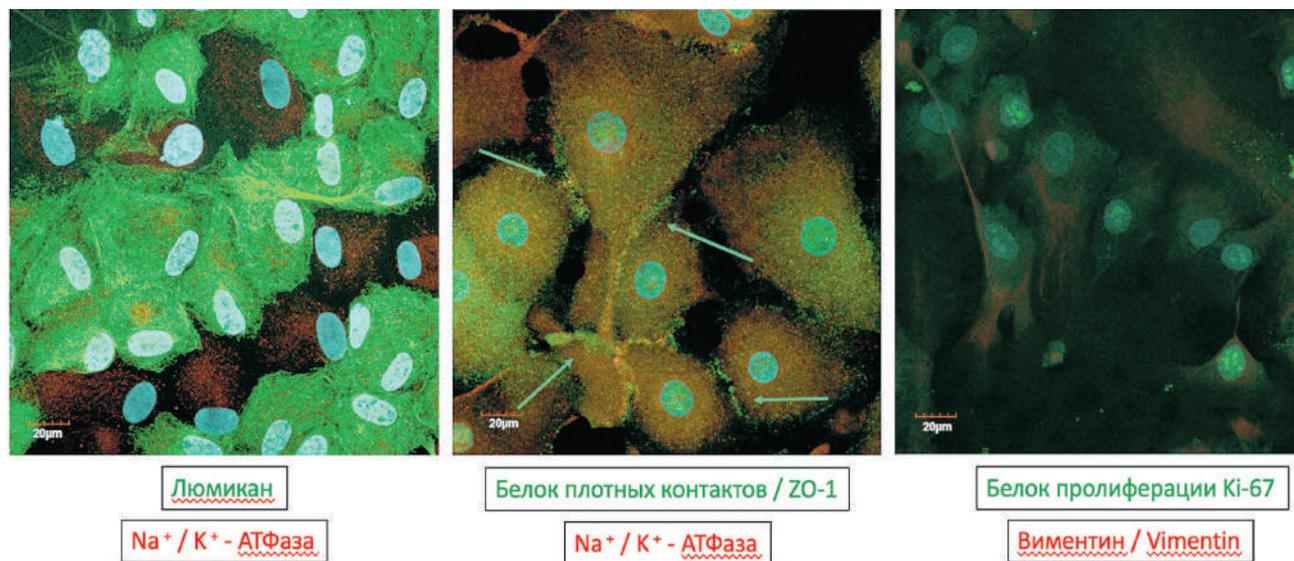


Рис. 5. Иммуногистохимическое исследование образца кадаверной роговицы во 2-м этапе эксперимента

Fig. 5. Immunohistochemical study of cadaveric cornea sample in the 2nd stage of the experiment

составила примерно $50 \pm 9\%$. С учетом формулы для измерения площади круга ($S = \pi r^2$), можно пересчитать площадь ДМ диаметром 6 мм с расчетом на плотность ЭК здоровой роговицы, равную 3200 кл/мм^2 . Для полного покрытия указанного дефекта монослоем клеток, необходимо их количество, примерно равное 9×10^4 . В нашем эксперименте количество ЭК в полученной суспензии при подсчете на приборе cells counter составило порядка 10×10^4 клеток. При этом после трансплантации суспензии на кадаверный корнеосклеральный диск нами было определено количество адаптированных на ДМ клеток в количестве порядка 50% от исходной величины, что составляет в абсолютных величинах $5,4 \times 10^4$ клеток на весь диаметр. Известно, что критически низким является количество в 500 кл/мм^2 , что достаточно для выполнения адекватной барьерной и насосной функции для поддержания прозрачности роговицы. Таким образом, для достижения минимальной плотности ЭК, способных поддержать прозрачность роговицы, необходимо введение не менее 25×10^4 клеток, с учетом запланированной потери.

Следует отметить, что в нашем эксперименте клетки распределялись по ДМ неравномерно и где-то были собраны в конгломераты, между которыми были участки оголенной ДМ. Тем самым их функциональная способность, вероятно, может быть неполноценной и требует дальнейшего изучения. Очевидно, что для максимального эффекта и большей плотности адаптированных клеток на единицу площади требуется увеличение количества клеток в суспензии. При этом повышается вероятность, что они покроют ДМ в центральной зоне роговицы.

Еще одним критерием эффективности эксперимента является качественная зачистка ДМ от имеющихся ЭК реципиента. Говоря о возможных показаниях к методу трансплантации суспензии ЭК, следует упомянуть декомпенсацию эндотелиального монослоя по причине его ятрогенного повреждения (буллезная кератопатия) или первичной генетически детерминированной патологии (дистрофия роговицы Фукса). В таком случае мы исходим из того, что у пациента имеется либо критически низкая плотность клеток в центральной зоне роговицы, как это характерно для эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, либо практически полное их отсутствие, что присуще диагнозу «буллезная кератопатия». Имея в виду данный факт, мы не исключаем, что полноценность зачистки эндотелия с ДМ в реальной клинической практике не столь значимо. Однако для оценки результатов проводимого нами эксперимента это может иметь существенное значение. Учитывая пока еще не изученные возможные пути потери клеток (на этапе имплантации, адгезии на структурах передней камеры, миграции в задний отрезок и трабекулярную сеть и т.п.), дальнейшей задачей исследования является получение максимального количества ЭК в суспензии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, учитывая все вышеизложенное, представляется актуальным выполнение дальнейших экспериментальных исследований по достижению основной цели – полноценному заполнению дефекта центральной зоны задней поверхности роговицы изолированными

ми ЭК, при условии сохранения их морфологии и функциональной активности. Стоит отметить, что идея реализации культивации эндотелия с потенциальным применением полученного продукта в реальной клинической практике на сегодняшний день нечетко регламентирована нормативно. При этом, по нашему мнению, данный метод наиболее перспективен для целей оказания хирургической помощи максимальному количеству пациентов с дисфункцией роговичного эндотелия на фоне дефицита донорского материала.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. 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.
2. Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanaka H, Yamamoto Y, Nakamura T, Inatomi T, Bush J, Toda M, Hagiya M, Yokota I, Teramukai S, Sotozono C, Hamuro J. Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy. *N Engl J Med*. 2018; 995–1003.
3. Melles G, Ong S, Ververs B, Van der Wees J. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea*. 2006;25(8): 987–990.
4. Weiss JS1, Møller HU, Aldave AJ, Seitz B, Bredrup C, Kivelä T, Munier FL, Rapuano CJ, Nischal KK, Kim EK, Sutphin J, Busin M, Labbé A, Kenyon KR, Kinoshita S, Lisch W. IC3D classification of corneal dystrophies-edition 2. *Cornea*. 2015;34(2): 117–159.
5. Gorovoy M. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*. 2006;25(8): 886–889.
6. Малюгин Б.Э., Шилова Н.Ф., Анисимова Н.С., Антонова О.П. Трансплантация эндотелия и Десцеметовой мембраны. *Вестник офтальмологии*. 2019;135(1):98–103. [Malyugin BE, Shilova NF, Anisimova NS, Antonova OP. Transplantation of endothelium and Descemet's membrane. *The Russian Annals of Ophthalmology*. 2019;135(1): 98–103. (In Russ.)]
7. Малюгин Б.Э., Гелястанов А.М., Антонова О.П. Тканесберегающая методика трансплантации Десцеметовой мембраны с монослоем эндотелиальных клеток для лечения эндотелиальной дисфункции. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019;21(5): 157. [Malyugin BE, Gelyastanov AM, Antonova OP. Tissue-saving technique of Descemet membrane transplantation with endothelial cell monolayer for the treatment of endothelial dysfunction. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019;21(5):157. (In Russ.)]
8. Малюгин Б.Э., Шилова Н.Ф., Антонова О.П., Анисимова Н.С., Шормаз И.Н. 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. 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].
9. Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Доступно по: <https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/23/stranitsa-967/federalnyy-zakon-ot-23-iyunya-2016-g-180-fz-o-biomeditsinskih-kletochnyh-produktah> [Ссылка активна на 28.09.2023] [Federal Law No. 180 of June 23, 2016 No. 180-FZ «On biomedical cell products». Available from <https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/23/stranitsa-967/federalnyy-zakon-ot-23-iyunya-2016-g-180-fz-o-biomeditsinskih-kletochnyh-produktah> [Accessed 28th September 2023] (In Russ.)]
10. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Островский Д.С., Антонова О.П., Хубецова М.Х., Цикаришвили Н.Р. 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, Ostrovskii DS, Antonova OP, Khubetsova MKh, 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. (In Russ.)]

Информация об авторах

Борис Эдуардович Малюгин, д.м.н., профессор, член-корр. РАН, boris.malyugin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5666-3493>
Сергей Анатольевич Борзенко, д.м.н., mdborzenok@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

Ольга Павловна Антонова, к.м.н., antonova.mntk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7414-0511>

Дмитрий Сергеевич Островский, к.б.н., dmitriy.ostrovskiy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>;

Зухра Рашитовна Эбзеева, врач-офтальмолог, ebzeeva.zuhra@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3074-5017>

Information about the authors

Boris E. Malyugin, Doctor of Sciences in Medicine, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, boris.malyugin@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5666-3493>

Sergey A. Borzenok, Doctor of Science in Medicine, Professor, mdborzenok@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

Olga P. Antonova, PhD in Medical Sciences, antonova.mntk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7414-0511>

Dmitrii S. Ostrovskii, PhD in Biological Sciences, dmitriy.ostrovskiy@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>

Zukhra R. Ebzeeva, Ophthalmologist, ebzeeva.zuhra@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3074-5017>

Вклад авторов в работу:

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

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

О.П. Антонова: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста.

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

З.Р. Эбзеева: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и обработка материала, написание текста.

Authors' contribution:

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

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

O.P. Antonova: significant contribution to the concept and design of the work, collection, analysis and processing of material, statistical data processing, writing.

D.S. Ostrovskii: significant contribution to the concept and design of the work, collection, analysis and processing of material, statistical data processing, writing.

Z.R. Ebzeeva: significant contribution to the concept and design of the work, collection, analysis and processing of material, writing.

Финансирование: Авторы получили грант в конкурсе «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований малыми отдельными научными группами» (2021). Название гранта «Разработка метода получения суспензии эндотелиальных клеток роговицы человека и ее последующей трансплантации в эксперименте *ex vivo*». Номер: 22-25-00356.

Согласие пациента на публикацию: Письменного согласия на публикацию этого материала получено не было. Он не содержит никакой личной идентифицирующей информации.

Конфликт интересов: Отсутствует.

Funding: The authors received a grant in the competition «Conducting fundamental scientific research and exploratory scientific research by small individual scientific groups» (2021). The grant title is «Development of a method for obtaining a suspension of human corneal endothelial cells and its subsequent transplantation in an *ex vivo* experiment». Number: 22-25-00356.

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.

Поступила: 22.10.2023
 Переработана: 14.11.2023
 Принята к печати: 30.11.2023

Originally received: 22.10.2023
 Final revision: 14.11.2023
 Accepted: 30.11.2023