

**ХАЦЕНКО ЕВГЕНИЙ ИГОРЕВИЧ**

**ТЕХНОЛОГИЯ ПОДГОТОВКИ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ  
3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО  
ЭПИТЕЛИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

14.01.07 – глазные болезни

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель: Борзенко Сергей Анатольевич** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заведующий Центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

**Официальные оппоненты:**

**Шелудченко Вячеслав Михайлович** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБНУ «НИИ глазных болезней»

**Темнов Андрей Александрович** – доктор медицинских наук, заместитель заведующего лабораторией химических и биотехнологических синтезов ФГАО УВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет).

**Ведущая организация:** ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «10» февраля 2020 г. в ... часов на заседании диссертационного совета Д.208.014.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) – это клеточный слой между нейросенсорной сетчаткой и сосудистой оболочкой, выполняющий ряд важнейших функций глаза (Bindewald A. et al., 2014; Simó R. et al., 2017; Strauss O. et al., 2016; Yu A. et al., 2018).

Одним из наиболее тяжелых, социально и эпидемиологически значимых заболеваний, связанных с дисфункцией РПЭ, является возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – хроническое прогрессирующее дистрофическое заболевание центральной зоны сетчатки, приводящее к постепенному снижению зрения. Патогенез развития ВМД до конца не изучен, но на сегодня принято считать, что он связан с нарушением транспортной и фагоцитарной функций РПЭ вследствие естественного процесса старения организма и различных триггерных факторов (Бойко Э.В., 2013; Bhutto I. et al., 2012; Ding X. et al., 2015; Nowak J.Z. et al., 2016).

На сегодня ВМД является одной из ведущих причин снижения зрения у людей старшей возрастной группы. Частота встречаемости данного заболевания в Российской Федерации составляет 15 случаев на 1000 человек, из которых 11% являются лицами трудоспособного возраста. По данным Всемирной организации здравоохранения, количество лиц, страдающих ВМД, в мире составляет 30-50 млн., из которых около 4 млн. человек являются юридически слепыми, и, по всей вероятности, количество таких пациентов будет расти соразмерно количеству населения и увеличению средней продолжительности жизни (Либман Е.С. с соавт., 2011; Mitchell J. et al., 2016; Eldeeb S.M. et al., 2016; Elshout M.A. et al., 2015; Yamagishi T. et al., 2015; Ying G.S. et al., 2017).

Традиционные методики лечения ВМД (консервативная терапия, интравитреальное введение ингибиторов неоангиогенеза, фотодинамическая терапия, удаление фибро-вазкулярных мембран, транслокация макулы) являются дорогостоящими, не всегда приводят к значимому улучшению зрения, а иногда и вовсе направлены на сохранение остаточных зрительных функций. Также всегда сохраняется риск рецидивирования патологического процесса (Бикбов М.М., Файзрахманов Р.Р., 2017; Будзинская М.В. с соавт., 2017; Володин П.Л. с соавт., 2019; Дога А.В. с соавт., 2018; Захаров В.Д. с соавт., 2015; Терещенко А.В. с соавт., 2017; Шелудченко В.М. с соавт., 2013).

Новым перспективным и патогенетически ориентированным методом лечения ВМД, находящимся на стыке фундаментальной и клинической

офтальмологии, является трансплантация аутологичного или аллогенного РПЭ в форме суспензии клеток или хориоидально-пигментного комплекса (ХПК).

Работы, описывающие технику субретинальной трансплантации аллогенного зрелого РПЭ в форме суспензии, не получили широкого клинического применения ввиду высокой частоты осложнений. Диссеминация клеток по субретинальному пространству приводила к образованию неоднородного клеточного слоя под сетчаткой. Диссеминация клеток в витреальную полость через ретинопунктурное отверстие способствовала развитию пролиферативной витреоретинопатии, образованию эпиретинальных мембран и возникновению отслойки сетчатки (ОС). Наличие субретинального фиброза с последующей атрофией фоторецепторов сетчатки свидетельствовало об эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) трансплантируемых клеток РПЭ (el Dirini A. et al., 1992; Gouras P. et al., 1985; Lavail M. et al., 1992).

Аутотрансплантация ХПК является высоко травматичным вмешательством, требует проведения значительного объема эндолазеркоагуляции (ЭЛК) сетчатки и тампонады витреальной полости силиконовым маслом (СМ). Также не исключается риск ЭМТ трансплантата (Chen F.K. et al., 2009; Heussen F.M. et al., 2008; van Meurs J.C. et al., 2004; Mac Laren R.E. et al., 2007).

Трансплантация фетального РПЭ в Российской Федерации, как и в большинстве стран мира, не проводится ввиду этического моратория (Del Priore L.V. et al., 2013; Humayun M.S et al., 2011; Radtke N.D. et al., 2014).

Работы, посвященные трансплантации РПЭ, полученного из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в большинстве случаев носят экспериментальный характер, поскольку существует риск трансформации данных клеток в раковые (De Juan E.J. et al., 2015; Diniz B. et al., 2013; Humayun M.S et al., 2018; Weisz J.M. et al., 2017).

Исходя из вышесказанного, невысокие анатомо-функциональные результаты после описанных способов трансплантации РПЭ связаны с несовершенством предлагаемых трансплантатов и способов их субретинальной доставки.

По мнению ряда авторов (Сабурина И.Н. с соавт., 2011; Борзенко С.А. с соавт., 2014) трансплантация РПЭ в форме многоклеточных 3D сфероидов могла бы решить вышеуказанные проблемы. Сфероид – это форма 3D клеточной культуры, в которой клетки, объединенные межклеточными связями, приближены к условиям нативной ткани. Сфероиды могут иметь диаметр от 50 до 700 мкм (в зависимости от количества клеток в сфероиде), на плоской поверхности проявляют адгезию и спрединг (т.е. распластывание с образованием клеточного

слоя), что позволяет снизить вероятность их диссеминации. Также, в сфероидах наблюдается разделение клеток по слоям – поверхностные слои содержат большое количество митотирующих клеток, имеющих признаки эпителия, а клетки внутреннего – гипоксигенированного слоя, находятся в состоянии динамического покоя. Следовательно, клетки сфероида образуют конгломерат, имеющий признаки естественной тканевой морфологии, что позволяет преодолеть явление ЭМТ.

Однако трансплантация РПЭ в форме 3D сфероидов требует проведения доклинических исследований, в офтальмологии традиционно проводимых на кроликах.

### **Цель настоящего исследования**

Разработка технологии предоперационной подготовки и техники трансплантации 3D клеточных сфероидов аллогенного ретинального пигментного эпителия в опыте на животных (кролики).

### **Задачи исследования**

1. Разработать метод конструирования трансплантатов 3D клеточных сфероидов из аллогенного ретинального пигментного эпителия кроликов.

2. Разработать хирургическую технику субретинальной трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте *in vivo*.

3. Провести морфологическое исследование внутриглазных оболочек кроликов после трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия с помощью гистологического исследования.

4. Провести клинико-морфологическое обоснование безопасности техники трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия с помощью биомикроскопии, офтальмоскопии и ультразвукового (УЗ) В-сканирования.

5. Изучить клинико-морфологическое состояние сетчатки кроликов после трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ).

6. Исследовать функциональное состояние нейросенсорной сетчатки кроликов после трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия посредством электроретинографии (ЭРГ).

## Научная новизна

1. Впервые показана возможность создания жизнеспособных трансплантатов 3D клеточных сфероидов необходимого диаметра с заданным количеством клеток из аллогенного РПЭ кроликов, а также доказано, что трехмерное культивирование позволяет сохранить клеточный фенотип кроличьего РПЭ.

2. Впервые разработана микроинвазивная техника субретинальной трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов на глазах кроликов, что позволяет проводить оперативное вмешательство одноэтапно и с минимальной травматизацией клеточных трансплантатов и тканей глаз реципиентов.

3. Впервые с помощью гистологического исследования показано, что 3D сфероиды РПЭ, трансплантируемые субретинально, быстро адгезируются и распластаются на нативном РПЭ реципиентов, образуя новый клеточный слой РПЭ не оказывая негативного влияния на состояние внутриглазных оболочек – сетчатку и хориоидею.

4. Впервые доказана безопасность разработанной техники трансплантации 3D сфероидов РПЭ посредством биомикроскопии, офтальмоскопии и УЗ В-сканирования.

5. Впервые посредством ОКТ показано, что 3D сфероиды РПЭ, трансплантируемые по предложенной технологии, доставляются в субретинальное пространство, а морфологические изменения состояния сетчатки в раннем послеоперационном периоде являются незначительными и обратимыми.

6. Впервые посредством ЭРГ доказано, что полное восстановление функционального состояния нейросенсорной сетчатки у кроликов после трансплантации 3D сфероидов РПЭ происходит на 20-е – 30-е сутки после проведения оперативного вмешательства.

## Практическая значимость

1. Разработанная технология выделения, культивирования и конструирования 3D трансплантатов РПЭ в виде сфероидов методом трехмерного культивирования является оптимальной экспериментальной моделью для дальнейшей субретинальной трансплантации и позволяет использовать ее на других животных.

2. Разработанная микрохирургическая техника в эксперименте на кроликах, заключающаяся в проведении микроинвазивной 25G витрэктомии, ретинопунктуры и субретинальном введении 3D сфероидов РПЭ позволяет безопасно доставлять клеточные трансплантаты в субретинальное пространство и может быть применима в опытах по трансплантации на других видах животных, а

также в дальнейшем быть применима для оперативного вмешательства на глазах человека.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработанная технология предоперационной подготовки кроличьего РПЭ, заключающаяся в трехмерном клеточном культивировании с последующим конструированием 3D сфероидов с использованием неадгезивных агарозных планшетов позволяет получать трансплантаты заданного диаметра с определенным количеством клеток и с сохранением их фенотипа, что подтверждается данными иммуоцитохимических и морфо-функциональных исследований *in vitro*.

2. Разработанная в эксперименте на кроликах микрохирургическая техника, заключающаяся в проведении 25G витректомии, ретинопунктуры и субретинальном введении 3D сфероидов РПЭ с тампонадой витреальной полости воздухом, позволяет доставлять клеточные трансплантаты в субретинальное пространство одноэтапно при биологически безопасных и обратимых осложнениях, что подтверждается гистологическими, клиническими и морфо-функциональными исследованиями.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XII Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 20 июня 2018 г.), на XVII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (Сочи, 22 марта 2019 г.), на XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения» (Москва, 27 июня 2019 г.), на научно-клинической конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (Москва, 14 декабря 2018 г.).

### **Внедрение в практику**

Результаты исследования внедрены в практику в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем (ЦФПМБП) ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, на их основе проводятся доклинические испытания в Головной организации, а также в Калужском, Краснодарском и Санкт-Петербургском филиалах ФГАУ «НМИЦ

«МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, а также включены в цикл лекций по основам трансплантологии и регенеративной медицины для клинических ординаторов, аспирантов и курсантов в Научно-педагогическом центре ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и кафедры Глазных болезней Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследования и разработке концепции экспериментального исследования, осуществлял сбор материала для исследования, участвовал и самостоятельно проводил экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo*. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведены статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 3 в журналах, рецензируемых ВАК РФ. Получен патент 1 РФ на изобретение.

### **Структура и объем диссертации**

Текст диссертации изложен на 141 странице, содержит 14 таблиц и 38 рисунков. Работа состоит из введения и 5 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, три главы результатов собственных исследований *in vitro* и *in vivo*, содержит общее заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы состоит из 140 источников, включающих 19 отечественных и 121 иностранную публикацию.

Фундаментальная часть исследования *in vitro* выполнена на базе ЦФПМБП ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заведующего Центром, д.м.н., профессора, академика РАЕН Борзенка С.А., при непосредственном участии заведующей Глазным тканевым банком, к.м.н. Хубецовой М.Х. и научного сотрудника, к.б.н. Островского Д.С.

Экспериментальные исследования *in vivo* выполнены на базе Калужского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (директор – д.м.н. Терещенко А.В.) под



руководством заместителя директора по научной работе, к.м.н. Трифаненковой И.Г. и, при непосредственном участии заведующего операционным блоком, к.м.н. Плахотного М.А. и заведующей диагностическим отделением № 2, к.м.н. Ерохиной Е.В.

Гистологические исследования выполнены на базе Лаборатории патологической анатомии и гистологии глаза ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России под руководством заведующей лабораторией, к.м.н. Шацких А.В.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Первый этап исследования включал в себя серию экспериментов *in vitro*, все этапы проводились на базе ЦФПМБП ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Для выделения РПЭ было использовано 20 глазных яблок от 10 доноров-кроликов, энуклеированных и помещенных в условия гипотермии в течение 4 часов. Применялась частично модифицированная техника препарирования, предложенная Борзенком С.А. и Поповым И.А. с соавт. (патент РФ на изобретение № 2569481 от 25.12.2014 г. «Способ получения культуры клеток ретинального пигментного эпителия из глаза взрослого донора-група»). Полученные клеточные культуры РПЭ нулевого пассажа (P0) разделяли на 2 равные группы – 1-ю (опытную) и 2-ю (контрольную), в зависимости от процентного содержания в объеме питательной среды факторов роста клеток – с целью определить возможность ускорения митоза клеток РПЭ.

Состав питательной среды:

1.FBS (*англ.* fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка, HyClone, США) – естественный источник фактора роста и адгезии клеток. 20% – 1-я группа (опытная) и 10% – 2-я группа (контрольная).

2.Ростовая среда Игла в модификации Дульбекко и среды Хэма (*англ.* Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12, DMEM/F12, Sigma, США) в соотношении 1:1 по объему. 78% – 1-я группа (опытная) и 88% – 2-я группа (контрольная). Базисная среда для выращивания широкого спектра клеточных культур. Содержит витамины, соли и аминокислоты.

3. Глутамакс (Gibco, США) – биологическая добавка для нормализации обмена веществ – 1%. Обладает антиоксидантным действием, содержит витамины, аминокислоты и микроэлементы.

4. Смесь антибиотиков: пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В (ПанЭко, Россия) – 1%.

Через 1 неделю проводили подсчет клеток (автоматический счетчик клеток «Luna II», Logos biosystems, Корея). По достижению конfluence (т.е. полного зарастания) клеточного слоя в каждом культуральном матрасе 1-й (опытная) и 2-й (контрольная) групп полученные 2D культуры РПЭ рассаживали на 3 культуральных матраса, получая культуру клеток РПЭ 1-го пассажа – P1. После получения достаточного количества клеток РПЭ P1 суспензии переносились в неадгезивные агарозные 81-луночные планшеты (3D Petri Dishes, Microtissue, США) в расчете 1000 клеток на 1 сфероид. Количество клеток в сфероиде обусловлено данными, полученными авторами в предыдущих исследованиях – сфероиды, состоящие из 1000 клеток, быстрее адгезируются к плоской поверхности и имеют диаметр около 100 мкм, что является приемлемым для их субретинальной трансплантации через канюли минимального диаметра. Также, такая концентрация клеток является оптимальной для свободной диффузии питательных веществ в 3D культуре и позволяет избежать центрального некроза, характерного при формировании более крупных сфероидов. Меньшее количество клеток в сфероиде нежелательно ввиду риска недостаточного терапевтического эффекта (Попов И.А., 2016; Хубецова, М.Х., 2017).

Для иммуноцитохимического исследования отдельно формировали 2D и 3D культуры РПЭ с целью выявления ряда специфических белковых маркеров (Abcam, Великобритания): RPE-65 – высокоспецифичный фермент пигментного эпителия сетчатки, один из ключевых белков зрительного цикла; ZO-1 (*лат. zonula occludens*) – белок запирающих межклеточных контактов; цитокератины – белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток, в клетках простого однослойного эпителия экспрессируются цитокератин 8 и цитокератин 18; виментин – белок промежуточных филаментов III типа, основной компонент мезенхимальных клеток, увеличение экспрессии виментина является признаком ЭМТ клеточной культуры.

За динамикой формирования сфероидов внутри лунок агарозных планшетов следили ежедневно в течение 30 дней, также проводили фоторегистрацию полученных клеточных культур, давали качественную оценку наблюдаемым явлениям, фиксировали изменение диаметра формирующихся микроагрегатов и оценивали форму (инвертированный световой фазово-контрастный микроскоп

«IX81» с интегрированной цифровой фотокамерой «XC10», Olympus, Япония). Смену питательной среды проводили каждые 2-3 дня.

Жизнеспособность сфероидов (4-е, 7-е, 11-е, 20-е и 30-е сутки культивирования) исследовали с помощью флуоресцентного красителя «Live and Dead» (Abcam, Великобритания). Также оценивали адгезивные свойства клеточных трансплантатов и их способность к спредингу в течение 14 суток.

В связи с необходимостью транспортировки сконструированных клеточных трансплантатов из культуральных лабораторий в операционные блоки, в данном случае из Головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России в Калужский филиал, 3D сфериды РПЭ (4-е, 7-е и 11-е сутки культивирования) также исследовали на жизнеспособность после краткосрочной гипотермической консервации ( $t=+4^{\circ}\text{C}$ , 4 ч) аналогичными методиками.

3D сфериды РПЭ (4-е, 7-е и 11-е сутки культивирования) после краткосрочной гипотермической консервации и нормотермического культивирования также оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с целью определения формы и диаметра (сканирующий электронный микроскоп «6000plus», Jeol, Япония).

Этап исследования *in vivo* проводили на 30 глазах 30 кроликов, разделенных на 3 равные группы – 2 опытные и контрольную. Кроликам из 1-й и 2-й опытных групп субретинально вводили 3D сфериды РПЭ в количестве 81 и 162 соответственно. Такое количество трансплантируемых сфероидов обусловлено количеством лунок в агарозных планшетах, используемых для трехмерного культивирования РПЭ. Кроликам из контрольной группы субретинально вводили 50 мкл стерильного физиологического раствора. Для оценки состояния структур глаз до оперативного вмешательства и в динамике на 1-е, 3-и, 7-е, 10-е, 14-е, 20-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки наблюдения после трансплантации РПЭ всем экспериментальным животным проводили стандартное и специализированное офтальмологическое обследование, а именно:

1. Биомикроскопия (ручная щелевая лампа, «Heine», Германия);
2. Офтальмоскопия (бинокулярный офтальмоскоп Скепенса, «Heine», Германия);
3. Фоторегистрация переднего отрезка глаза и глазного дна (диагностическая ретинальная система «RetCam-120», США);
4. ЭРГ (электрофизиологический комплекс «EP-1000 Pro», Tomey, Япония);
5. УЗ В-сканирование внутриглазных оболочек (УЗ А/В сканер и биометр «UD-6000», Tomey, Япония);

## 6. ОКТ сетчатки («Askin Spectralis», Heidelberg engineering, Германия).

Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-и, 7-е, 10-е, 14-е, 20-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки после оперативного вмешательства под общим наркозом путем воздушной эмболии с соблюдением правил биоэтики. Глазные яблоки энуклеировали для последующих гистологических исследований. Далее выполняли серии гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозином. Препараты изучали с помощью инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа с интегрированной цифровой фотокамерой при x50, x100, x200, x400-кратном увеличении с последующим фотографированием с целью оценки состояния внутриглазных структур.

Статистическую обработку полученных в ходе эксперимента данных осуществляли на персональном компьютере с программным обеспечением Statistica 10. Для оценки полученных данных использовали методы параметрической описательной статистики с определением средней арифметической величины (M) и стандартного отклонения ( $\pm\sigma$ ). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента: в случаях сопоставления разных исследуемых групп – для независимых выборок; в случае оценки динамики исследуемых показателей в одной группе или оценки различий – для зависимых выборок. Различия сравниваемых показателей принимали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования in vitro**

Через 1 неделю после выделения и начала культивирования в 1-й опытной группе – с удвоенным процентным содержанием ростовых факторов в питательной среде, количество полученных клеток РПЭ составило  $8,71 \times 10^6$ . Во 2-й контрольной группе (стандартный состав питательной среды) было получено  $2,29 \times 10^6$  клеток РПЭ. Было установлено, что удвоенное количество ростовых факторов в питательной среде достоверно способствует увеличению количества клеток РПЭ за значительно более короткий промежуток времени ( $p < 0,05$ ).

Полученные культуры клеток РПЭ P0 1-й (опытная) и 2-й (контрольная) групп имели характерную полигональную форму с большим количеством пигмента. Клетки РПЭ P1 в обеих группах также имели схожие фенотипические характеристики, отмечалось уменьшение количества пигмента.

Проведенное иммуноцитохимическое исследование 2D культур РПЭ P1 1-й (опытная) и 2-й (контрольная) групп показало наличие ярко выраженной

экспрессии высокоспецифичного маркера пигментного эпителия сетчатки RPE-65, что свидетельствовало о сохранности фенотипа полученных клеточных культур. Экспрессия цитокератинов 8, 18 (белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток) в обеих группах также была значительной. В клеточных образцах РПЭ обеих групп также отмечалась экспрессия маркера ZO-1 (белок запирающих межклеточных контактов) и умеренная экспрессия мезенхимального маркера виментина. Однако, согласно литературным данным, при 2D культивировании РПЭ возможно наличие данного маркера в 2D культуре, что не исключает эпителиальную природу полученных клеток, т.к. данный белок входит в состав промежуточных филаментов (Hunt R.C., Davis A.A., 1990). Следовательно, проведенное иммуноцитохимическое исследование 2D культуры РПЭ Р1 показало, что клетки, выделенные и культивированные по предложенной технологии, сохранили свой фенотип. Также было установлено, что удвоенное количество ростовых факторов в питательной среде является допустимым и не способствует ЭМТ клеточных культур РПЭ. Это дало возможность перейти к следующему этапу исследования – трехмерному клеточному культивированию РПЭ.

Для конструирования 3D сфероидов использовали клетки РПЭ Р1 из 1-й (опытная) группы. В ходе трехмерного культивирования была отмечена постепенная компактизация полученных сфероидов, и, к 7-м суткам наблюдалось образование гладких трансплантатов округлой формы, их средний диаметр составил  $88,8 \pm 9,2$  мкм, что является приемлемым для трансплантации через канюли минимального диаметра (рис. 1). Следовательно, 1000 клеток РПЭ в одном сфероиде является оптимальным количеством. Дальнейшее культивирование (до 30-х суток) не приводило к статистически значимому изменению размеров сфероидов ( $p > 0,05$ ), что свидетельствовало о завершении процесса сфероидогенеза.

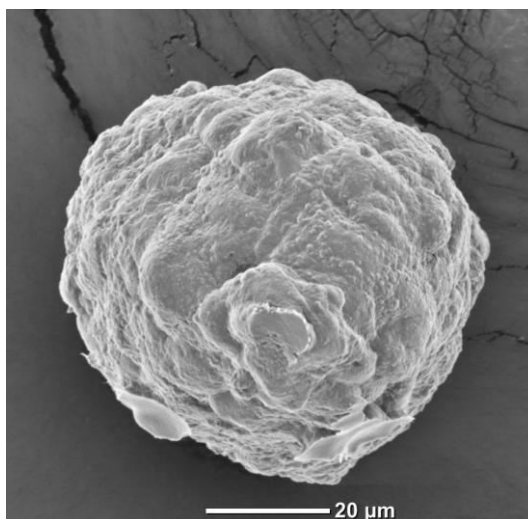
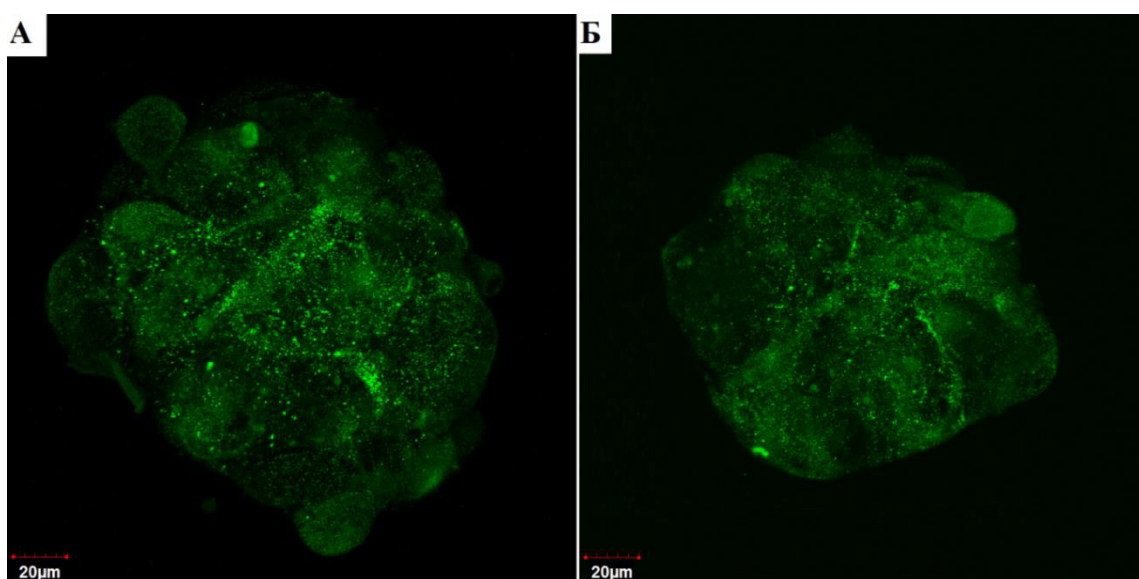


Рисунок 1 – 3D сфероид РПЭ, сканирующая электронная микроскопия, ув. x1000

При иммуноцитохимическом окрашивании было выявлено, что 3D сфероиды РПЭ активно экспрессируют маркеры RPE-65 (высокоспецифичный маркер пигментного эпителия сетчатки, *рис. 2*), ZO-1 (белок запирающих межклеточных контактов) и цитокератины 8, 18 (белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток), и практически не экспрессируют мезенхимальный маркер виментин. Фенотипические характеристики оставались стабильными на всех сроках культивирования (до 30-х суток). Это свидетельствует о преимуществе 3D культивирования РПЭ с целью сохранения фенотипа.



а – 7-е сутки культивирования; б – 30-е сутки культивирования

Рисунок 2 – 3D сфероиды РПЭ. Выраженная экспрессия маркера RPE-65

При изучении жизнеспособности с использованием флуоресцентного набора «Live and Dead» было выявлено сохранение жизнеспособности формируемых сфероидов на всем периоде наблюдения – вплоть до 30-х суток культивирования. Также, 3D сфероиды РПЭ на всех сроках культивирования проявляли выраженные адгезивные свойства и при спрединге в течение 1-й недели образовывали клеточный монослой. Адгезия сфероидов и распространение вокруг них слоя клеток – важнейшие составляющие процессов приживления трансплантатов РПЭ.

При изучении жизнеспособности трехмерных клеточных культур после краткосрочной гипотермической консервации было установлено, что 3D сфероиды РПЭ на 4-е и 7-е сутки культивирования полностью состояли из «живых» клеток и проявляли выраженные адгезивные свойства с последующим спредингом. 11-и суточные сфероиды преимущественно состояли из «мертвых» клеток, проявляли менее выраженные адгезивные свойства и при спрединге образовывали клеточный слой меньший по площади. Следовательно, на данном

этапе были определены оптимальные сроки предтрансплантационного культивирования 3D сфероидов РПЭ в случае необходимости их транспортировки в условиях гипотермии – 7-е сутки.

При проведении СЭМ 3D сфероидов РПЭ визуализировали клеточные трансплантаты округлой формы. Сфероиды после нормотермического культивирования имели относительно гладкую поверхность. Поверхность сфероидов после гипотермической консервации выглядела умеренно бугристо. По мере увеличения сроков культивирования отмечалось уменьшение диаметра сфероидов, поверхность сфероидов становилась более бугристой.

Таким образом, в ходе проведения исследований *in vitro*, было установлено, что модифицированная техника выделения РПЭ является приемлемой для кадаверных кроличьих глаз. 2D культивирование РПЭ с удвоенным количеством ростовых факторов в питательной среде достоверно способствует увеличению количества клеток за меньший промежуток времени и не вызывает ЭМТ клеточных культур, что подтверждено иммуноцитохимическими исследованиями. Клетки кроличьего РПЭ, культивированные в форме многоклеточных 3D сфероидов, оставались жизнеспособными и сохраняли фенотип вплоть до 30-х суток культивирования при нормотермическом культивировании и до 7-х суток после краткосрочной гипотермической консервации, что также подтверждено иммуноцитохимическими исследованиями. Это дало возможность перейти к следующему этапу диссертационного исследования – трансплантации полученных 3D клеточных сфероидов РПЭ кроликам-донорам.

### **Результаты исследования *in vivo***

На данном этапе, согласно 2-й – 6-й задачам диссертационного исследования, на кроликах разрабатывали хирургическую технику трансплантации 3D сфероидов РПЭ. В послеоперационном периоде, с целью подтверждения безопасности и эффективности предложенной хирургической техники проводили клинико-морфологические и функциональные исследования.

#### ***Разработанная модифицированная хирургическая техника***

Всем кроликам за 30 минут до операции в конъюнктивальную полость оперируемого глаза инстиллировали 1-2 капли 1% раствора тропикамида для достижения медикаментозного мидриаза. В качестве анестезии выполняли общий наркоз, который осуществляли внутримышечным введением 1% раствора гексанала из расчета 0,5 мл на 1 кг веса животного. Общее обезболивание

дополняли 3-кратной инстилляцией в конъюнктивальную полость 0,5% раствора проксиметакаина. Перед операцией конъюнктивальную полость промывали раствором пиклоксидина 0,05%. Иммобилизацию животных производили путем тугого бинтования.

Под контролем операционного микроскопа («Opton CFC-6», Carl Zeiss, Германия) проводили лимбальную перитомию, в 2 мм от лимба на 2, 8 и 10 часах устанавливали три порта 25G в проекции плоской части цилиарного тела для входа эндовитреального инструментария и инфузионной системы. Фиксировали инфузионную систему, вводили световод, витреотом, выполняли витрэктомию (2500 резов в минуту, вакуум 600 мм рт. ст.) с удалением центральных и задних отделов стекловидного тела (витреоретинальная система «Accurus», Alcon, США). Далее канюлей 25G с острым кончиком 39G («Poly Trip», RUMEX International, США) делали ретинопунктуру выше места центральной зоны сетчатки на 2-3 мм и кроликам из опытных групп субретинально инъецировали 3D сфероиды РПЭ в количестве 81 (10 кроликов – 1-я опытная группа) и 162 (10 кроликов – 2-я опытная группа). Клеточные культуры трансплантировали в жидкой среде – 50 мкл стерильного физиологического раствора (BSS Plus, *англ.* balanced sterile saline solution, сбалансированный стерильный солевой раствор, Bausch & Lomb, США). Животным контрольной группы (n=10) субретинально вводили 50 мкл стерильного BSS Plus.

Устройство для введения клеточных трансплантатов представляет собой шприц с адаптером («MicroDose injection kit 1 ml», Med One, США), подключаемый к аппарату для комбинированной хирургии. При нажатии на педаль управления витреоретинальной системой поршень начинает ход, и вещество из шприца доставляется субретинально.

ЭЛК сетчатки вокруг ретинопунктурного отверстия не проводили. Операции заканчивали аспирацией жидкости из витреальной полости с заменой на стерильный воздух и наложением швов на склеральные и конъюнктивальные разрезы (Coated Vicryl 8-0, Ethicon, США). На предложенный способ трансплантации РПЭ в эксперименте получен патент РФ на изобретение № 2704094 от 22.08.2019 г. В послеоперационном периоде всем кроликам проводили стандартную антибактериальную и противовоспалительную терапию в течение двух недель.

Таким образом, на данном этапе, была разработана модифицированная микрохирургическая техника субретинальной трансплантации 3D сфероидов РПЭ, заключающаяся в проведении 25G витрэктомии, ретинопунктуры и субретинальном введении 3D сфероидов РПЭ с тампонадой витреальной полости воздухом. Ни в одном случае не было выявлено интраоперационных осложнений, не потребовалось тампонады витреальной полости СМ. По завершению



операционного вмешательства сетчатка прилежала во всех случаях, необходимости в проведении ЭЛК не возникло.

При **биомикроскопии** в 1-е сутки после оперативного вмешательства клиническая картина на всех глазах у прооперированных животных была схожей: отмечалась конъюнктивальная инъекция в зоне склеротомических и конъюнктивальных разрезов, швы были адаптированы, роговица прозрачная, передняя камера средней глубины, влага передней камеры прозрачная, радужка структурная, зрачок округлый в центре. Значимых помутнений в хрусталике, снижающих визуализацию глазного дна, выявлено не было. Уровень воздуха составлял  $1/3 - 1/2$  от объема витреальной полости. Рефлекс с глазного дна был розовый во всех случаях. По мере увеличения сроков наблюдения глаза у всех кроликов успокаивались, уровень воздуха в витреальной полости уменьшался. К 10-м суткам шовный материал в зоне разрезов практически не визуализировался. Оптические среды оставались прозрачными и позволяли визуализировать глазное дно на всем периоде наблюдения. Биомикроскопическая картина на последующих сроках наблюдения у всех кроликов была стабильной.

При бинокулярной обратной **офтальмоскопии** в 1-е сутки на всех прооперированных глазах опытных и контрольной групп визуализировали бледно-розовый диск зрительного нерва (ДЗН) с четкими границами, в зоне субретинальной инъекции отмечали наличие локальной плоской ОС и отека сетчатки, ретинопунктурное отверстие не визуализировали. На 3-и сутки во всех случаях отмечали прилегание оболочек, ретинопунктурное отверстие также не визуализировали, отек сетчатки уменьшался. Офтальмоскопическая картина на последующих сроках наблюдения у всех кроликов была стабильной.

При проведении **УЗ В-сканирования** внутриглазных оболочек у всех кроликов в зоне субретинальной инъекции также визуализировали локальную плоскую ОС, которая полностью исчезала к 3-м суткам. В контрольной группе средняя высота ОС составила  $0,27 \pm 0,02$  мм, в 1-й и 2-й опытных группах –  $0,34 \pm 0,03$  мм и  $0,39 \pm 0,03$  мм соответственно.

Таким образом, можно сделать вывод, что предложенная хирургическая техника в раннем послеоперационном периоде вызывает локальную плоскую ОС и отек сетчатки в зоне введения клеточных трансплантатов. Однако данное явление является обратимым, а высота ОС напрямую зависит от количества трансплантируемых клеточных культур.

С целью подтверждения безопасности предложенной в данной работе хирургической техники всем кроликам выполняли **электроретинографическое**

**исследование** для оценки функционального состояния нейросенсорной сетчатки после субретинальной трансплантации 3D сфероидов РПЭ.

За норму были приняты показатели ЭРГ, полученные до проведения оперативного вмешательства: амплитуда а-волны –  $45,8 \pm 4,2$  мкВ, латентность –  $18,2 \pm 1,3$  мс, амплитуда b-волны –  $86,3 \pm 7,3$  мкВ, латентность –  $48,7 \pm 1,2$  мс. Амплитуда а-волны отражает активность фоторецепторов, b-волны – биполяров и клеток Мюллера. Полученные показатели дооперационной ЭРГ у кроликов являются сопоставимыми с данными литературы (Manna S. et al., 2016).

В раннем послеоперационном периоде у всех кроликов в опытных и контрольной группах отмечали снижение биоэлектрической активности сетчатки. В 1-е сутки у кроликов из 1-й опытной группы амплитуда а-волны составила  $15,9 \pm 1,8$  мкВ, латентность –  $19,5 \pm 1,4$  мс, амплитуда b-волны –  $37,1 \pm 4,2$  мкВ, латентность –  $49,4 \pm 1,3$  мс. У кроликов из 2-й опытной группы амплитуда а-волны –  $15,3 \pm 1,9$  мкВ, латентность –  $19,8 \pm 1,6$  мс, амплитуда b-волны –  $36,2 \pm 4,5$  мкВ, латентность –  $49,9 \pm 1,5$  мс. У кроликов из контрольной группы амплитуда а-волны –  $16,6 \pm 1,7$  мкВ, латентность –  $18,7 \pm 1,3$  мс, амплитуда b-волны –  $38,8 \pm 3,5$  мкВ, латентность –  $48,4 \pm 1,2$  мс. Полученные показатели свидетельствуют об умеренном повреждении сетчатки вследствие операционной травмы. Согласно литературным данным, такие электроретинографические показатели в раннем послеоперационном периоде после трансплантации РПЭ является допустимыми (Abe T. et al., 1999).

В последующие сроки наблюдения во всех группах отмечали постепенное восстановление биоэлектрической активности нейросенсорной сетчатки к исходным значениям. Наиболее быстрое восстановление электроретинографических показателей к исходным отмечали в контрольной группе – к 14 дню амплитуда а-волны составила  $44,5 \pm 4,1$  мкВ, латентность –  $18,7 \pm 1,3$  мс и амплитуда b-волны –  $85,9 \pm 7,4$  мкВ, латентность –  $49,2 \pm 1,2$  мс. Восстановление биоэлектрической активности сетчатки в 1-й и 2-й опытных группах происходило к 20-м и 30-м суткам соответственно и составило в 1-й опытной группе: амплитуда а-волны –  $44,1 \pm 4,1$  мкВ, латентность –  $18,9 \pm 1,4$  мс, амплитуда b-волны –  $84,8 \pm 7,7$  мкВ, латентность –  $48,7 \pm 1,5$  мс; во 2-й опытной группе: амплитуда а-волны –  $43,6 \pm 3,9$  мкВ, латентность –  $18,8 \pm 1,5$  мс, амплитуда b-волны –  $83,6 \pm 7,2$  мкВ, латентность –  $49,5 \pm 1,8$  мс.

В последующие сроки наблюдения электроретинографические показатели сетчатки у всех кроликов оставались стабильными.

Таким образом, в ходе проведения электроретинографического исследования кроликов после субретинальной трансплантации 3D сфероидов РПЭ было показано, что предложенная хирургическая техника вызывает умеренное снижение биоэлектрической активности нейросенсорной сетчатки в

послеоперационном периоде, однако данные изменения являются обратимыми, а сроки полного восстановления функционального состояния сетчатки напрямую связаны с количеством трансплантируемого клеточного материала.

При проведении **ОКТ** за норму толщины сетчатки были приняты показатели, полученные до проведения оперативного вмешательства в аналогичной зоне –  $145 \pm 5$  мкм. Полученные показатели толщины сетчатки являются сопоставимыми с данными литературы (Xiao-Xu Z. et al., 2012).

По данным ОКТ, в 1-е сутки после оперативного вмешательства у кроликов контрольной группы средняя толщина сетчатки составила  $254 \pm 21$  мкм, у кроликов из 1-й и 2-й опытных групп –  $302 \pm 28$  мкм и  $332 \pm 30$  мкм соответственно. У всех животных визуализировали локальную плоскую ОС и отек сетчатки в зоне субретинальной инъекции. У кроликов из опытных группы субретинально обнаруживали трансплантаты округлой формы диаметром 60 – 80 мкм. По мере увеличения сроков наблюдения трансплантаты приобретали форму, близкую к овальной, т.е. отмечали их уплощение. Ретинопунктурное отверстие не визуализировали. Толщина сетчатки у всех животных постепенно возвращалась к исходным значениям: у кроликов из контрольной группы – к 10-м суткам, и составила  $146 \pm 5$  мкм; у кроликов из 1-й опытной группы – к 14-м суткам, и составила  $143 \pm 4$  мкм; у кроликов из 2-й опытной группы – к 20-м суткам, и составила  $144 \pm 5$  мкм. По данным ОКТ, дегенеративных изменений в нейросенсорной сетчатке не было отмечено ни в опытных, ни в контрольной группах.

Таким образом, в ходе проведения ОКТ сетчатки кроликов, было показано, что предложенная хирургическая техника позволяет доставить 3D сфероиды РПЭ субретинально, а осложнения (локальная плоская ОС и отек сетчатки), возникающие в раннем послеоперационном периоде, являются биологически безопасными и обратимыми. Также было показано, что 3D сфероиды РПЭ адгезируются к нативному РПЭ кроликов-реципиентов и, впоследствии, уплощаются и распластываются, что способствует образованию нового клеточного слоя РПЭ.

При проведении *гистологического исследования* в энуклеированных глазах животных опытных и контрольной групп в течение всего срока наблюдения не было обнаружено патологических изменений внутриглазных структур. В витреальной полости патологических клеточных элементов также обнаружено не было. Изменений в ДЗН и центральных сосудах сетчатки не наблюдали. Во всех отделах на всех сроках исследования архитектоника сетчатки была сохранена, не выявлено каких-либо признаков повреждения фоторецепторов, стратификация слоев не нарушена, пролиферативных изменений не отмечено.

В 1-е сутки после проведения хирургического вмешательства на всех глазах опытных групп субретинально обнаруживали округлые трансплантаты диаметром 50 – 80 мкм, адгезированные к нативному РПЭ кроликов-реципиентов – 3D сфероиды РПЭ. Адгезия 3D сфероидов РПЭ является признаком жизнеспособности клеточных трансплантатов. Также отмечали утолщение сетчатки, что являлось естественной патофизиологической реакцией в ответ на операционную травму. В контрольной группе также визуализировали утолщение сетчатки.

На 3-и сутки на всех глазах опытных групп также субретинально были обнаружены 3D сфероиды РПЭ, адгезированные к нативному РПЭ и имеющие тенденцию к уплощению, что свидетельствует о начале процесса спрединга. Распластывание сфероидов также является признаком жизнеспособности трансплантатов. Утолщение сетчатки по-прежнему сохранялось во всех группах.

На 7-е сутки на всех глазах опытных групп субретинально визуализировали уплощенные трансплантаты, адгезированные к РПЭ реципиентов и образующие новый клеточный слой, что свидетельствует о продолжении процесса спрединга. Толщина сетчатки в опытных и контрольной группах уменьшалась.

На 10-е сутки на всех глазах опытных групп субретинально визуализировали клеточный слой РПЭ, утолщения и дегенеративных изменений фоторецепторов не было обнаружено, отмечали прилегание сетчатки к сосудистой оболочке. В контрольной группе сетчатка выглядела интактно.

В последующие сроки наблюдения морфологическая картина внутриглазных структур кроликов была стабильна.

Таким образом, в ходе проведения гистологического исследования, было показано, что сфероиды РПЭ, трансплантируемые субретинально по предложенной технологии, являются жизнеспособными, так как адгезируются к нативному РПЭ кроликов-реципиентов и по мере увеличения сроков наблюдения распластываются, что способствует образованию нового клеточного слоя РПЭ. Также, ни в одном случае не было обнаружено 3D сфероидов в витреальной полости, что свидетельствует о том, что клеточные трансплантаты не диссеминируют в витреальную полость. Отсутствие структурных нарушений со стороны оболочек глаза и его внутренних сред на микроскопическом уровне подтвердили безопасность субретинальной трансплантации РПЭ в форме 3D клеточных сфероидов.

## ВЫВОДЫ

1. На основании иммуноцитохимических и гистологических исследований показано, что разработанная технология конструирования 3D клеточных сфероидов из кроличьего ретинального пигментного эпителия позволяет получать трансплантаты определенного диаметра с заданным количеством клеток (1000 клеток ретинального пигментного эпителия в одном сфероиде, средний диаметр сфероида  $88,8 \pm 9,2$  мкм), сохранять их фенотип, а также повышать их адгезивные свойства и жизнеспособность *in vitro*, в том числе и после краткосрочной гипотермической консервации в течение 7-и суток.

2. Разработанная модифицированная техника трансплантации ретинального пигментного эпителия в форме 3D клеточных сфероидов проводится в один этап эндовитреальным доступом 25G, является микроинвазивной и малотравматичной, а ретинопунтурное отверстие для введения трансплантатов, выполняемое канюлей с острым кончиком 39G, не требует проведения эндолазерной коагуляции сетчатки в парацентральных отделах.

3. С помощью метода световой микроскопии гистологических срезов внутриглазных оболочек показано, что 3D сфероиды ретинального пигментного эпителия после трансплантации в субретинальное пространство предложенным способом адгезируются к нативному ретинальному пигментному эпителию кроликов-реципиентов в 1-е сутки с последующим образованием нового клеточного слоя к 10-м суткам.

4. Проведенное с помощью биомикроскопии, офтальмоскопии и ультразвукового В-сканирования клинично-морфологическое обоснование безопасности техники трансплантации ретинального пигментного эпителия в форме 3D сфероидов показало, что наличие локальной плоской отслойки сетчатки высотой до  $0,39 \pm 0,03$  мм в месте субретинального введения клеточных трансплантатов в раннем послеоперационном периоде является обратимым в течение 3-х суток.

5. Разработанная хирургическая техника субретинальной трансплантации ретинального пигментного эпителия в форме 3D сфероидов сопровождается биологически безопасными (отек сетчатки до  $332 \pm 30$  мкм) и обратимыми (до 20-и суток) осложнениями сетчатки, что доказано методом оптической когерентной томографии.

6. Трансплантация 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия является безопасной для функционального состояния нейросенсорной сетчатки, а реактивные изменения (снижение биоэлектрической активности сетчатки – амплитуды а-волны до  $15,9 \pm 1,8$  мкВ при латентности  $19,5 \pm 1,4$  мс, амплитуды в-

волны до  $37,1 \pm 4,2$  мкВ при латентности до  $49,4 \pm 1,3$  мс) являются обратимыми и нивелируются к 20-м – 30-м суткам после оперативного вмешательства, что доказано данными электроретинографии.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для получения однородной суспензии клеток ретинального пигментного эпителия из трупного кроличьего глаза без ее контаминации клеточными и экстрацеллюлярными компонентами сетчатой оболочки и стекловидного тела рекомендуется использовать базисную методику препарирования глазного яблока, частично модифицированную. Производится выкраивание корнеосклерального диска трепаном 7 мм, рассечение склеры тремя меридиональными разрезами спереди назад длиной  $2/3$  вдоль глазного яблока, отгибание лепестков склеры с последующим удалением, нанесение трех разрезов на хориоидально-пигментный комплекс. При этом первый круговой разрез выполняется на расстоянии 1 мм от зубчатой линии, а первый меридиональный разрез – в любом меридиане в направлении от первого разреза спереди назад к культе диска зрительного нерва; второй круговой разрез – на расстоянии 1 мм от культи зрительного нерва с последующим отделением хориоидально-пигментного комплекса от нейросенсорной сетчатки пинцетом и укладыванием на дно стерильной чашки Петри клетками ретинального пигментного эпителия вверх и заливкой 2 мл 0,25%-го раствора трипсина.

2. Для конструирования клеточных трансплантатов в виде 3D сфероидов из ретинального пигментного эпителия рекомендуется использовать клеточные 2D культуры 1-го пассажа с последующим перенесением в 81-луночные агарозные планшеты и инкубированием при стандартных условиях (температура  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% концентрация  $\text{CO}_2$ , 100% влажность) в течение 7-и суток. Оптимальным посевным количеством клеток ретинального пигментного эпителия на один сфероид следует считать 1000 клеток.

3. Для трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия рекомендуется проводить микроинвазивную трехпортовую 25G витрэктомию через pars plana, ретинопунктуру канюлей с острым кончиком калибра 39G с последующим введением клеточных культур под сетчатку, используя устройство для субретинальных инъекций, подключаемое к аппарату для витреоретинальной хирургии. Оперативное вмешательство следует завершать аспирацией жидкости из витреальной полости с последующей заменой на стерильный воздух и наложением швов на склеральные и конъюнктивальные разрезы.

Протокол послеоперационного фармакологического пособия является стандартным после витреоретинальных операций и включает в себя местную антибактериальную и противовоспалительную терапию в течение 2-х недель.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Борзенко С.А., Захаров В.Д., Горшков И.М., Островский Д.С., Хаценко Е.И., Казанцев А.Д. Разработка техники выделения ретинального пигментного эпителия кролика с последующим конструированием 3D-сфероидов // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – № 1. – С. 55-57.

2. Хаценко Е.И., Борзенко С.А., Захаров В.Д., Горшков И.М., Островский Д.С., Герасимов М.Ю., Куприянова А.Г. Разработка техники трансплантации 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – № 4. – С. 258-260.

3. Борзенко С.А., Горшков И.М., Хаценко Е.И., Герасимов М.Ю., Островский Д.С. Техника конструирования и трансплантации 3D-клеточных сфероидов ретинального пигментного эпителия кроликов в эксперименте IN VITRO // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Том 20. – С. 160-161.

4. Борзенко С.А., Хаценко Е.И., Островский Д.С., Хубецова М.Х., Шацких А.В., Трифаненкова И.Г., Плахотный М.А., Ерохина Е.В. Первый опыт трансплантации 3D-сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте // Офтальмохирургия. – 2019. – № 1. – С. 27-32.

5. Борзенко С.А., Хаценко Е.И., Островский Д.С., Хубецова М.Х., Шацких А.В., Трифаненкова И.Г., Плахотный М.А., Ерохина Е.В. Разработка техники трансплантации 3D-клеточных сфероидов ретинального пигментного эпителия в опыте на животных // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Том 21. – № 2. – С. 84-91.

**ПАТЕНТ РФ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

Патент РФ на изобретение № 2704094 от 22.08.2019 г. «Способ трансплантации ретинального пигментного эпителия в форме 3D клеточных сфероидов в эксперименте». Авторы: Борзенко С.А., Хаценко Е.И., Горшков И.М., Плахотный М.А., Трифаненкова И.Г.

## БИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Хаценко Евгений Игоревич, 1990 года рождения, в 2014 году окончил ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России по специальности «Педиатрия». В 2015 году окончил ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России по специальности «Менеджмент».

С 2014 по 2016 гг. проходил обучение в клинической ординатуре по специальности «Офтальмология» в ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

С 2016 по 2019 гг. проходил обучение в очной аспирантуре по специальности «Глазные болезни» в ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Регулярный участник отечественных и зарубежных офтальмологических конференций. Член EURETINA (European Society of Retina Specialists) и ESCRS (European Society of Cataract & Refractive Surgeons).

Автор 5 научных работ, из них 3 в журналах, рецензируемых ВАК РФ, 1 патента РФ на изобретение.

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВМД – возрастная макулярная дегенерация

ДЗН – диск зрительного нерва

ОКТ – оптическая когерентная томография

ОС – отслойка сетчатки

РПЭ – ретинальный пигментный эпителий

УЗ – ультразвуковой

ХПК – хориоидально-пигментный комплекс

ЦФПМБП – Центр фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем

ЭЛК – эндолазеркоагуляция

ЭМТ – эпителиально-мезенхимальная трансформация

DMEM/F12 – *англ.* Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12, смесь питательных сред – среды Игла в модификации Дульбекко и среды Хэма F12 в соотношении 1:1

FBS – *англ.* fetal bovine serum, эмбриональная телячья сыворотка

2D – *англ.* two-dimensional, двухмерный

3D – *англ.* three-dimensional, трехмерный