

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-2-84-91

РАЗРАБОТКА ТЕХНИКИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ 3D-КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ОПЫТЕ НА ЖИВОТНЫХ

С.А. Борзенко^{1, 3}, Е.И. Хаценко¹, Д.С. Островский^{1, 4}, М.Х. Хубецова¹,
А.В. Шацких¹, И.Г. Трифаненкова², М.А. Плахотный²,
Е.В. Ерохина²

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

² ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Калужский филиал, Калуга, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Российская Федерация

Цель исследования. Разработка техники трансплантации 3D-клеточных сфероидов ретинального пигментного эпителия (РПЭ) на глазах экспериментальных животных (кролики). **Материалы и методы.** 3D-сфероиды РПЭ для последующей трансплантации создавали с использованием агарозных планшетов (3D Petri Dishes, Microtissue, США). Фенотип полученных клеточных культур исследовали с помощью иммуноцитохимического анализа (лазерный сканирующий конфокальный микроскоп «Fluo View FV10i», Olympus, Япония). Всем экспериментальным животным (кролики породы шиншилла, n = 10) выполняли витрэктомию – 2500 резов в минуту, вакуум 600 мм рт. ст. (Alcon, Accurus, США), ретиноматию и субретинально вводили сфероиды РПЭ (MicroDose injection kit 1 ml, Med One, США). Методы послеоперационного контроля: ультразвуковое В-сканирование глаза (Ultrasonic UD-6000, Tomey, Япония) и оптическая когерентная томография – ОКТ (Askin Spectralis, Heidelberg engineering, Германия). Глазные яблоки энуклеировали на 7, 10, 14, 20-е сутки для последующего гистологического исследования. **Результаты.** Иммуноцитохимическое окрашивание выявило сохранение фенотипа РПЭ в форме 3D-сфероидов. В послеоперационном периоде у всех экспериментальных животных по данным ультразвукового В-сканирования и ОКТ отмечалась схожая клиническая картина: отек и плоская отслойка сетчатки в зоне оперативного вмешательства. По мере наблюдения сетчатка прилегала и отек сетчатки уменьшался. Также, по данным ОКТ, субретинально обнаруживались округлые конгломераты диаметром от 60 до 80 мкм – предположительно 3D-сфероиды РПЭ. По данным гистологического исследования отмечалась адгезия сфероидов РПЭ к сосудистой оболочке с последующим распластыванием и образованием нового клеточного слоя по мере увеличения сроков наблюдения. **Заключение.** Предложенная технология культивирования кроличьего РПЭ с последующим конструированием 3D-сфероидов позволяет сохранить эпителиальный фенотип клеток. Разработанная хирургическая техника трансплантации РПЭ является приемлемой и может использоваться для дальнейших экспериментальных исследований с целью внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, 3D-сфероиды, возрастная макулярная дегенерация.

Для корреспонденции: Хаценко Евгений Игоревич. Адрес: 117452, Москва, Балаклавский проспект, 16, кв. 502. Тел. (916) 101-75-72. E-mail: e.hacenko@mail.ru

For correspondence: Khatsenko Evgeny Igorevich. Address: 16/502, Balaklavsky avenue, Moscow, 117452, Russian Federation. Tel. (916) 101-75-72. E-mail: e.hacenko@mail.ru

THE DEVELOPMENT OF TRANSPLANTATION TECHNIQUE OF 3D SPHEROIDS RETINAL PIGMENT EPITHELIUM IN THE EXPERIMENT ON ANIMALS

S.A. Borzenok^{1, 3}, E.I. Khatsenko¹, D.S. Ostrovskiy^{1, 4}, M.K. Khubetsova¹, A.V. Shatskikh¹, I.G. Trifanenkova², M.A. Plakhotnyi², E.V. Erokhina²

¹ S.N. Fedorov NMRC «MNTK «Eye Microsurgery», Moscow, Russian Federation

² S.N. Fedorov NMRC «MNTK «Eye Microsurgery», the Kaluga Branch, Kaluga, Russian Federation

³ FSBEI HE «A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry» MOH, Moscow, Russian Federation

⁴ The Institute of General pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Aim. This research is aimed to devise the technique for transplantation of 3D spheroids retinal pigment epithelium (RPE) in the experimental animal's eyes (rabbits). **Materials and methods.** 3D spheroids of RPE for subsequent transplantation were created using agarose tablets (3D Petri Dishes, Microtissue, USA). The phenotype of the obtained cell cultures was studied by immunocytochemical tests (laser scanning confocal microscope "Fluo View FV10i", Olympus, Japan). Vitrectomy – 2500 cuts per minute, vacuum 600 mm Hg (Alcon, Accurus, USA) was performed on all rabbits (n = 10). Then, we made retinotomy and injected spheroids in subretinal space (MicroDose injection kit 1 ml, Med One, USA). The following methods of control: ultrasound B-scan (Ultrasonic UD-6000, Tomey, Japan) and optical coherence tomography (OCT), (Askin Spectralis, Heidelberg engineering, Germany). Eyes were enucleated for histological examination on 7, 10, 14 and 20 days. **Results.** Immunocytochemical tests revealed preservation of the RPE epithelial phenotype in 3D spheroids. Clinical map was similar in all experimental animals – during the first 7 days after surgery we saw cystic edema and flat retinal detachment in the surgery area. As we observed, the retina was adjoining and retinal edema was decreasing. Also, on day 3, 7 and 10 on OCT we saw subretinal round conglomerates with a diameter of 60 to 80 μm – presumably RPE 3D spheroids. According to histological findings, there was observed adhesion of the RPE spheroids to the choroid with subsequent spreading and formation of new cell layer with the increase of observation periods. **Conclusion.** The proposed technology of cultivation of rabbit RPE with subsequent construction of 3D spheroids allows to preserve the epithelial phenotype of cells. The developed surgical technique of RPE transplantation is acceptable and can be used for further experimental studies to be implemented in clinical practice.

Key words: retinal pigment epithelium, 3D spheroid, age-related macular degeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее тяжелых и социально значимых заболеваний, связанных с нарушением работы ретиального пигментного эпителия (РПЭ), является возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – это хроническое прогрессирующее дистрофическое заболевание центральной зоны сетчатки, приводящее к постепенному и необратимому снижению зрения [17].

ВМД является третьим заболеванием в мире (после катаракты и глаукомы), приводящим к слепоте (по данным ВОЗ), встречается у 20% людей старше 50 лет, а частота распространения в Российской Федерации составляет 15 случаев на 1000 человек. Триггерными факторами являются курение, злоупотребление алкоголем, чрезмерное пребывание на солнце, ожирение, гипертоническая болезнь, авитаминозы, этнические особенности и др. [4].

Традиционными методиками лечения ВМД являются:

1) метаболическая терапия биодобавками и поливитаминами комплексами – может быть эффектив-

на на начальных стадиях заболевания и в целях его профилактики [1];

2) интравитреальное введение anti-VEGF препаратов – эффективно подавляет процессы неоваскулогенеза, однако данный вид лечения требует неоднократных инъекций, является дорогостоящим, при далеко зашедших стадиях заболевания не приводит к значимому улучшению зрения, и при этом не исключается риск рецидива неоваскуляризации [13];

3) фотодинамическая терапия и хирургическое иссечение субретинальных фиброваскулярных мембран (СНМ) – данные методики также не приводят к существенному улучшению зрения и больше направлены на сохранение остаточных зрительных функций [2, 16].

Новым перспективным методом лечения ВМД является трансплантация РПЭ в форме суспензии клеток [7] или клеточного монослоя на мембране Бруха [10] через трансцилиарный [8] или транссклеральный доступы [11].

По нашему мнению, более современной формой трансплантата РПЭ является многоклеточный сфероид – это форма 3D-клеточной культуры, в которой клетки приближены к условиям нативной ткани.

3D-сфероиды РПЭ могут иметь диаметр от 50 до 700 мкм, на плоской поверхности проявляют адгезию и спрединг (распластывание с образованием клеточного слоя), что позволяет снизить вероятность их диссеминации.

Также в сфероидах наблюдается разделение клеток по слоям – поверхностные клетки проявляют эпителиальный фенотип, а центральные – мезенхимальный, что позволяет снизить риск эпителиально-мезенхимального перехода [3].

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

В доступной литературе отсутствуют работы, описывающие технику культивирования кроличьего РПЭ для создания 3D-сфероидов и методику их трансплантации.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка техники трансплантации 3D-сфероидов РПЭ на глазах экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Этап исследований *in vitro*

Все исследования *in vitro* проводились на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем головной организации МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова.

После энуклеации глазных яблок ($n = 4$) у кроликов породы шиншилла выделяли хориоидально-пигментный комплекс, укладывали в чашку Петри и заливали 5 мл питательной среды. Состав питательной среды: DMEM/F12 – 88% (Sigma, США); ЭТС (HyClone, США) – 10%; Глутамакс (Gibco, США) – 1%; раствор антибиотиков – пенициллин, стрептомицин, амфоцетрин В (Sigma, США) – 1%. Культивирование осуществлялось при стандартных условиях – 5% CO₂, $t = 37$ °С. Смена питательной среды проводилась каждые 3 дня. По достижении полной конfluenceности клетки РПЭ переносились в агарозные планшеты в расчете 1000 клеток на 1 сфероид.

Для иммуноцитохимического исследования полученные 3D-культуры сфероидов изучали на 3, 7 и 11-е сутки сфероидогенеза (лазерный сканирующий конфокальный микроскоп «Fluo View FV10i», Olympus, Япония). Оценивали экспрессию характерных эпителиальных маркеров (Alexa Fluor, Великобритания), таких как RPE-65 (высокоспецифичный маркер пигментного эпителия), ZO-1 (белок запи-

рающих межклеточных контактов), цитокератин 8, 18 (белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток), а также мезенхимального маркера виментина. Для идентификации указанных маркеров использовали вторичные антитела AlexaFluor 488, 594 (Abcam, Великобритания).

2. Этап исследований *in vivo*

II этап исследования проводился на базе Калужского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова и включал в себя трансплантацию полученных клеточных культур 10 кроликам породы шиншилла (10 глаз). Клеточные трансплантаты перевозились в условиях гипотермии (+4 °С).

Перед операцией всем экспериментальным животным промывали конъюнктивальную полость раствором антисептика (Пиклоксидин 0,05%). Всем кроликам в качестве анестезии выполняли общий наркоз (1% раствор Гексенала внутримышечно, 0,5 мл на 1 кг веса животного). Общее обезболивание дополняли 3-кратной инстилляцией анестетика в конъюнктивальную полость (Проксиметакаин 0,5%). Под контролем операционного микроскопа «Opton» CFC-6 (Германия) проводили лимбальную перитомию, в 2 мм от лимба на 2, 8 и 10 часах устанавливали три порта 25Ga в проекции плоской части цилиарного тела для входа эндовитреального инструментария и инфузионной системы. Фиксировали инфузионную систему, вводили световод, витреотом, выполняли центральную хромовитрэктомию – 2500 резов в минуту, вакуум 600 мм рт. ст. (Alcon, Accurus, США). Далее острой канюлей 39 Ga делали ретиномическое отверстие на 2–3 мм выше места центральной зоны сетчатки. Устройство для введения клеточных трансплантатов представляет из себя шприц, подключаемый к аппарату для комбинированной хирургии (MicroDose injection kit 1 ml, Med One, США). При нажатии на педаль поршень шприца начинает ход, и сфероиды ($n = 81$), находящиеся в жидкой среде (0,05 мл BSS+), доставляются субретинально. Операции заканчивались заменой жидкости на воздух и наложением швов на склеральные разрезы и конъюнктиву. Эндолазерная коагуляция сетчатки вокруг ретиномического отверстия не проводилась.

В послеоперационном периоде всем кроликам проводилась стандартная антибактериальная и противовоспалительная терапия в течение двух недель.

В качестве методов контроля экспериментальным животным в послеоперационном периоде проводили: ультразвуковое В-сканирование глаза – 1-е сутки (Ultrasonic UD-6000, Tomey, Япония) и оптическую когерентную томографию (ОКТ) – 3, 7, 10, 14, 20-е сутки (Askin Spectralis, Heidelberg engineering, Германия).

Животные выводились из эксперимента на 7, 10, 14 и 20-е сутки наблюдения путем воздушной эмбо-

лии. Глазные яблоки энуклеировались и фиксировались в 10% растворе формалина для последующего гистологического исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Этап исследований *in vitro*

Из трупных кроличьих глаз через 14 дней после начала культивирования было получено $1,12 \times 10^6$ клеток РПЭ, из которых в последующем было сконструировано 1100 3D-сфероидов (рис. 1).

В ходе культивирования была отмечена постепенная компактизация полученных 3D-сфероидов, и к 7-м суткам наблюдалось образование гладких сфероидов, их диаметр в среднем составлял от 80 до 90 микрон. Дальнейшее культивирование не приводило к изменению размеров, что свидетельствовало о завершении процесса сфероидогенеза.

При проведении иммуноцитохимического окрашивания полученных 3D-культур отмечалось наличие ярко выраженной экспрессии характерного высокоспецифичного маркера пигментного эпителия сетчатки RPE-65, а также эпителиальных маркеров цитокератина 8,18 и ZO-1. При этом отмечалась стабильная экспрессия указанных маркеров на всем периоде культивирования (3, 7 и 11-е сутки). Кроме того, экспрессия мезенхимального маркера виментина была слабой, что свидетельствует о преимуществе 3D-культивирования эпителиальных клеток для со-

хранения их фенотипа. На рис. 2 и 3 представлены результаты иммуноцитохимического окрашивания 3D-сфероидов РПЭ.

В связи с необходимостью перевозки донорского материала была изучена жизнеспособность сфероидов после пребывания при температуре $+4^\circ\text{C}$ в течение 4 часов. Оценка жизнеспособности осуществлялась путем изучения адгезивных свойств

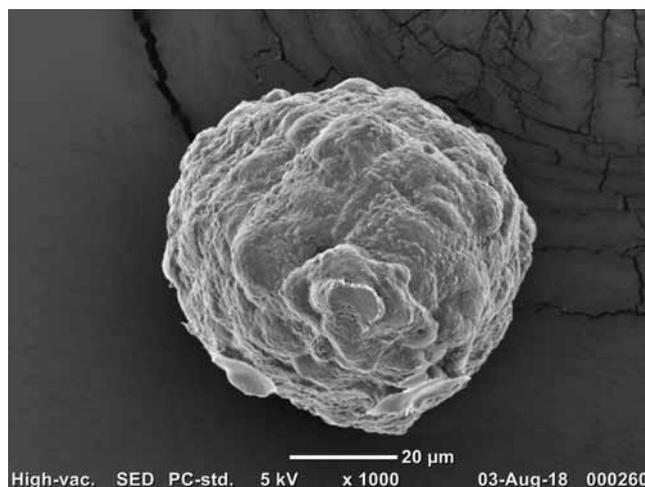


Рис. 1. 3D-сфероид РПЭ. Сканирующая электронная микроскопия. $\times 1000$

Fig 1. 3D spheroid RPE. Scanning electronic microscopy. $\times 1000$

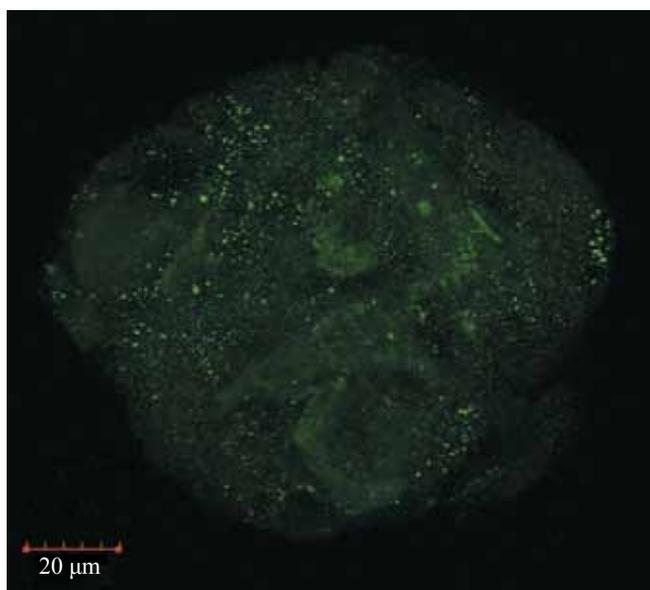


Рис. 2. Ярко выраженная экспрессия маркера RPE-6 (зеленый) полученными 3D-сфероидами, 11-е сутки культивирования (AlexaFluor 488)

Fig. 2. 3D spheroid PRE, 11 day of cultivation. High expression of RPE-65 (green) (AlexaFluor 488)

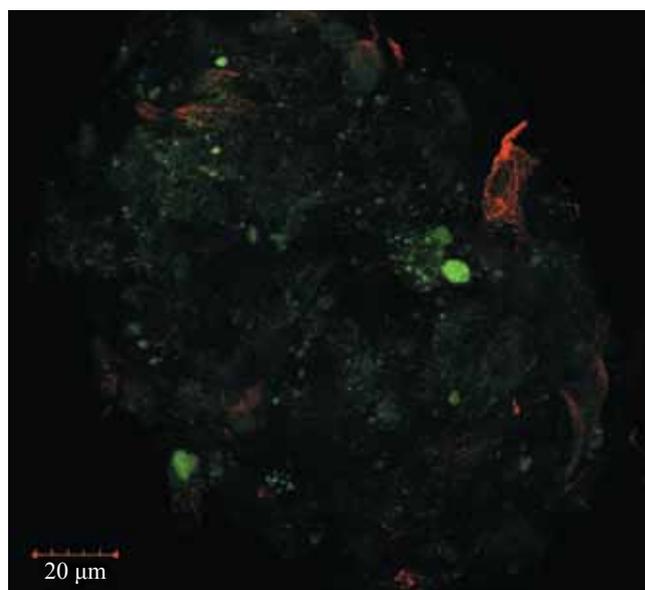


Рис. 3. 3D-сфероид РПЭ на 11-е сутки культивирования. Выраженная экспрессия эпителиального маркера Цитокератина 8,18 (зеленый) и слабая экспрессия мезенхимального маркера Виментина (красный) (AlexaFluor 594)

Fig. 3. 3D spheroid PRE, 11 day of cultivation. High expression of Cytokeratin 8,18 (green), (epithelial marker) and weak expression of Vimentin (red), (mesenchymal marker), (AlexaFluor 594)

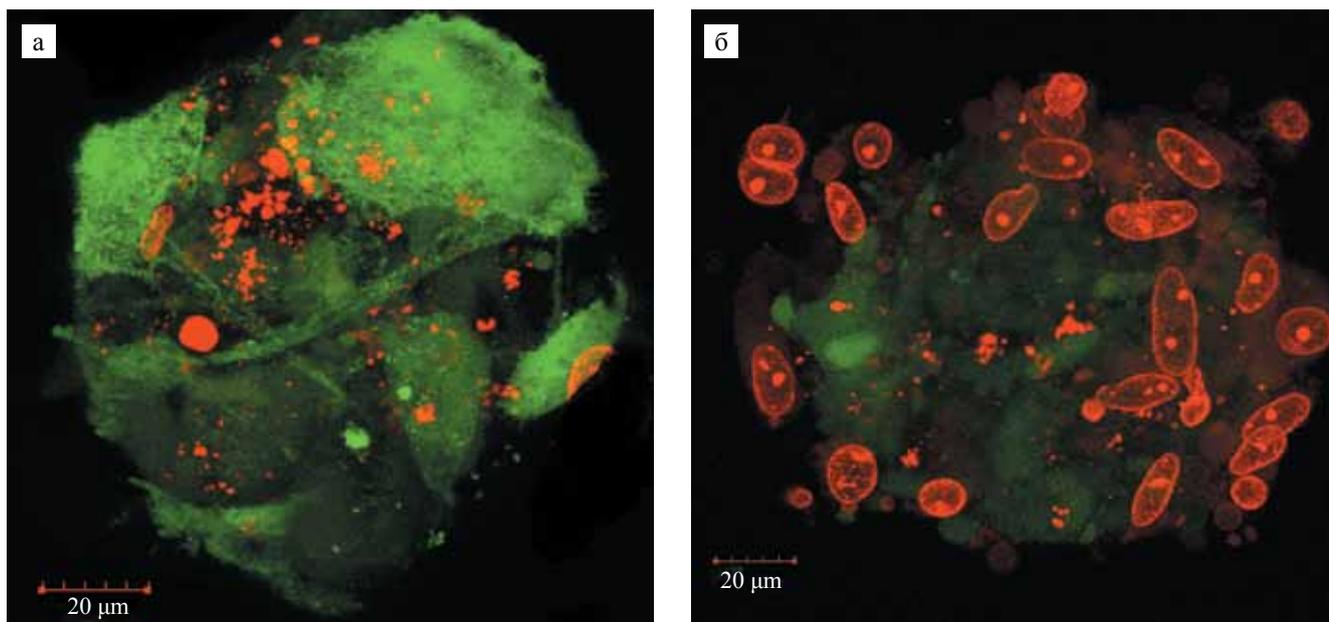


Рис. 4. 3D-сфероиды РПЭ после пребывания в условиях гипотермии (жизнеспособные клетки окрашены в зеленый цвет, нежизнеспособные клетки окрашены в красный цвет, окрашивание маркером «Live and Dead»): а – жизнеспособный 3D-сфероид РПЭ (7-е сутки культивирования); б – нежизнеспособный сфероид (11-е сутки культивирования)

Fig. 4. 3D spheroids of PRE after staying in hypothermia (viable cells are colored green, non-viable cells are colored red, staining with a marker «Live and Dead»): а – viable 3D spheroid (7 day of cultivation); б – unviable 3D spheroid (11 day of cultivation)

сфероидов и методом флюоресцентного окрашивания маркером «Live and Dead» (Abcam, Великобритания). Было выявлено сохранение жизнеспособности сфероидов вплоть до 7 суток наблюдения. Таким образом, нами были определены оптимальные сроки предтрансплантационного культивирования 3D-сфероидов РПЭ. На рис. 4 представлены 3D-сфероиды РПЭ после пребывания в условиях гипотермии.

2. Этап исследований *in vivo*

В первые сутки после оперативного вмешательства на всех прооперированных глазах клиническая картина была схожей: отмечалась инъекция глазного яблока в зоне проведения хирургического вмешательства, швы конъюнктивы были адаптированы, роговица прозрачная, передняя камера средней глубины, влага передней камеры прозрачная, радужка спокойна, выраженных помутнений хрусталика не наблюдалось. При проведении ультразвукового В-сканирования в 1-е сутки у 6 кроликов отмечалась плоская отслойка сетчатки в зоне оперативного вмешательства высотой до 1 мм, у 4 кроликов отмечалось прилегание оболочек, отслойка сетчатки не визуализировалась. Уровень воздуха составлял менее 1/2 объема витреальной полости.

ОКТ-картина морфологического состояния сетчатки была схожей у всех экспериментальных животных: в зоне оперативного вмешательства отмечался

кистозный отек и плоская отслойка сетчатки. Данные изменения отмечались в течение первых 7 суток после хирургии. По мере наблюдения сетчатка прилегала и отек сетчатки уменьшался. Также на 3, 7 и 10-е сутки субретинально обнаруживались округлые конгломераты диаметром от 60 до 80 мкм – предположительно 3D-сфероиды РПЭ. При проведении ОКТ на 14-е и 20-е сутки значимых изменений морфологического состояния сетчатки не наблюдалось. На рис. 5 и 6 представлены оптические когерентные

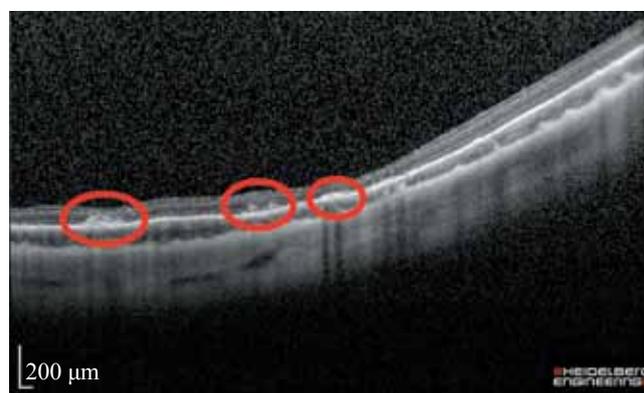


Рис. 5. ОКТ сетчатки кролика, 7-е сутки после трансплантации 3D-сфероидов РПЭ. Субретинально обнаруживаются округлые трансплантаты РПЭ

Fig. 5. OCT of retina, 7 day after 3D spheroids transplantation. Found rounded subretinal grafts of RPE

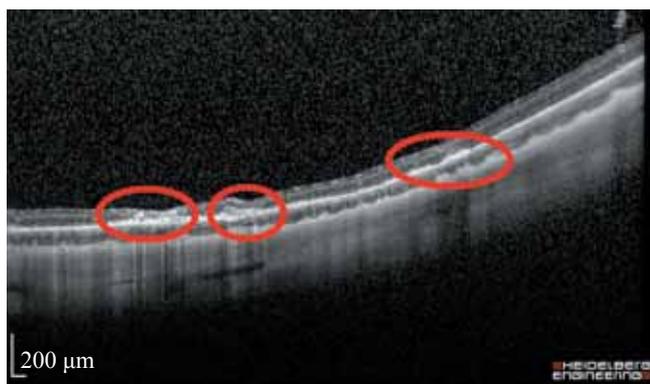


Рис. 6. ОКТ сетчатки кролика, 10-е сутки после трансплантации 3D-сфероидов РПЭ. Субретинально обнаруживаются трансплантаты РПЭ с тенденцией к расплыванию

Fig. 6. OCT of retina, 10 day after 3D spheroids transplantation. Subretinal RPE grafts are detected with a tendency to spread



Рис. 7. Гистологический срез, окраска гематоксилин-эозином. 3-и сутки после трансплантации 3D-сфероидов РПЭ

Fig. 7. Histological section, colouring with hematoxylin-eosin. 3 day after transplantation 3D spheroids RPE

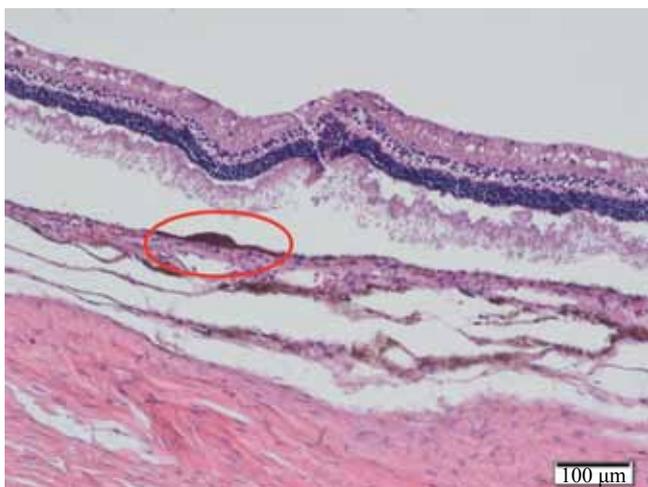


Рис. 8. Гистологический срез, окраска гематоксилин-эозином. 10-е сутки после трансплантации 3D-сфероидов РПЭ

Fig. 8. Histological section, colouring with hematoxylin-eosin. 10 day after transplantation 3D spheroids RPE

томограммы сетчатки кроликов после трансплантации 3D-сфероидов РПЭ на различных сроках наблюдения.

По данным гистологического исследования отмечалась адгезия сфероидов РПЭ к сосудистой оболочке с последующим расплыванием и образованием нового клеточного слоя по мере увеличения сроков наблюдения. На рис. 7 и 8 представлены гистологические срезы оболочек глазных яблок кроликов на различных сроках наблюдения.

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодня в мировой офтальмологической практике большинство трансплантаций РПЭ выполняются через трансклиарный доступ при помощи эндовитреального хирургического инструментария [5]. Это позволяет доставлять клеточные трансплантаты в необходимую зону под визуальным контролем (в отличие от трансклерального доступа).

В большинстве случаев используется донорский аллогенный РПЭ [12], так как для трансплантации аутологичного РПЭ необходимо индуцировать отслойку сетчатки и с периферических отделов выкроить участок сосудистой оболочки с пигментным эпителием [15]. Данный вид вмешательства является травматичным, и в послеоперационном периоде существует высокий риск таких осложнений, как отслойка сетчатки, гемофтальм, пролиферативная витреоретинопатия (ПВР), эпиретинальный фиброз (ЭРФ) [6]. Также после индукции отслойки сетчатки необходимо проведение тампонады витреальной полости силиконовым маслом, что подразумевает проведение второго этапа операции по поводу его удаления.

При проведении трансплантации аллогенного РПЭ клеточные трансплантаты можно условно разделить на 2 вида: суспензия клеток и лоскут хориоидея + РПЭ.

По данным литературы, при трансплантации суспензии клеток РПЭ большинство клеток диссеминируют в витреальную полость через ретиномическое отверстие и не замещают дефект в РПЭ реципиента вследствие неравномерного распределения по субретинальному пространству, а попадая в витреальную полость, могут вызывать развитие ПВР, ЭРФ и отслойку сетчатки. Также при трансплантации суспензии клеток РПЭ обнаруживалось преобладание клеток мезенхимального фенотипа, утративших полярность, что является следствием эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток РПЭ после их удаления с мембраны Бруха [9].

Для трансплантации лоскута хориоидея + РПЭ необходимо выполнять ретиномическое отверстие диаметром не менее 2 мм, уложить трансплан-

тат нужной стороной вверх, расправить и провести эндолазеркоагуляцию ретиномического отверстия. Данное вмешательство является более травматичным, требует дальнейших разработок нового инструментария для введения трансплантата, всегда существует риск укладки лоскута слоем РПЭ вниз, возможна травматизация лоскута. Не исключается и риск вышеперечисленных осложнений, и зачастую требуется введение силиконового масла [9].

Таким образом, основными требованиями, предъявляемыми к трансплантации РПЭ, являются: малоинвазивность, снижение риска диссеминации клеток в витреальную полость и по субретинальному пространству, отсутствие необходимости во введении силиконового масла (одноэтапная хирургия). Крайне актуальным критерием для клеточных трансплантатов является сохранение их эпителиального фенотипа, так как трансформация в мезенхимальные клетки является одной из ведущих причин развития пролиферативных процессов.

На предтрансплантационном этапе во время проведения иммуноцитохимических исследований нами было доказано, что 3D-сфероиды РПЭ сохраняют свой эпителиальный фенотип вплоть до 11-х суток культивирования.

В ходе проведения инструментальных методов исследования в послеоперационном периоде нами было показано, что осложнения (плоская локальная отслойка сетчатки, кистозный отек сетчатки), вызываемые предложенной в работе хирургической техникой, являются неопасными и обратимыми.

При офтальмоскопии и В-сканировании в послеоперационном периоде ни у одного кролика не было отмечено развитие ПВР, следовательно, сфероиды РПЭ после трансплантации быстро адгезируются к сосудистой оболочке и не диссеминируют в витреальную полость.

Ретиномическое отверстие, выполняемое канюлей калибра 39 Га, не требует проведения эндолазеркоагуляции сетчатки. Введения силиконового масла также не потребовалось ни в одном случае.

Предложенную хирургическую технику можно считать микроинвазивной и малотравматичной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенная технология культивирования кроличьего РПЭ с последующим конструированием 3D-сфероидов позволяет сохранить эпителиальный фенотип клеток, что подтверждается данными иммуноцитохимических исследований. Разработанная хирургическая техника трансплантации РПЭ является приемлемой, что подтверждается данными оптической когерентной томографии и гистологическими исследованиями. Предложенная хирургическая техника субретинальной трансплантации 3D-сфероидов РПЭ является перспективной для дальнейших экспериментальных исследований с целью внедрения в клиническую практику.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Балашова ЛМ. Витаминно-минеральные комплексы и здоровье глаз. *Клиническая офтальмология*. 2008; 9 (1): 41–45. Balashova LM. Vitaminno-mineral'nye komplekсы i zdorov'e glaz. *Klinicheskaya oftal'mologiya*. 2008; 9 (1): 41–45.
2. Бикбов ММ, Файзрахманов РР. Оперативное лечение пациентов с фиброваскулярными мембранами при макулярной дегенерации с частичным восстановлением пигментного эпителия сетчатки. *Современные технологии в офтальмологии*. 2017; 1: 35–38. Bikbov MM, Fajzrahmanov RR. Operativnoe lechenie pacientov s fibrovaskulyarnymi membranami pri makulyarnoj degeneracii s chastichnym vosstanovleniem pigmentnogo epiteliya setchatki. *Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii*. 2017; 1: 35–38.
3. Борзенко СА, Кошелева АВ, Попов ИА, Сабурова ИИ и др. 3D-культивирование ретинального пигментного эпителия трупных донорских глаз человека на предтрансплантационном этапе. *VII Всероссийский съезд трансплантологов. Материалы съезда*. М., 2014: 262–263. Borzenok SA, Kosheleva AV, Popov IA, Saburina IN i dr. 3D-kul'tivirovanie retinal'nogo pigmentnogo epiteliya trupnyh donorskih glaz cheloveka na predtransplantacionnom etape. *VII Vserossijskij s'ezd transplantologov. Materialy s'ezda*. М., 2014: 262–263.
4. Либман ЕС, Шахова ЕВ. Слепота, слабовидение и инвалидность по зрению в Российской Федерации. *Российский межрегиональный симпозиум «Ликвидация устранимой слепоты: Всемирная инициатива ВОЗ»*: Материалы. М., 2003: 38–42. Libman ES, Shahova EV. Slepota, slabovidenie i invalidnost' po zreniyu v Rossijskoj Federacii. *Rossijskij mezhregional'nyj simpozium «Likvidaciya ustranimoj slepoty: Vsemirnaya iniciativa VOZ»*: Materialy. М., 2003: 38–42.
5. Algever PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y, Kopp ED. Transplantation of RPE in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1997; 235 (3): 149–158.
6. Binder S, Krebs I, Hilgers RD, Abri A, Stolba U, Assaoulina A et al. Outcome of transplantation of autologous retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration: a prospective trial. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45 (11): 4151–4160.
7. Binder S, Stolba U, Krebs I, Kellner L, Jahn C, Feichtinger H et al. Transplantation of autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration: a pilot study. *Am J Ophthalmol*. 2002; 133 (2): 215–225.

8. Bindewald A, Roth F, Van Meurs J, Holz FG. Transplantation of retinal pigment epithelium (RPE) following CNV removal in patients with AMD. Techniques, results, outlook. *Ophthalmologie*. 2004; 101 (9): 886–894.
9. Caramoy A, Liakopoulos S, Kirchhof B. Recurrence of choroidal neovascular membrane after autologous transplantation of RPE and choroid for neovascular AMD. *Acta Ophthalmol*. 2011; 89 (8): 666–668.
10. Falkner-Radler CI, Krebs I, Glittenberg K et al. Human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation: outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomized clinical study. *Br. J. Ophthalmol*. 2011; 95: 370–375.
11. Cuiping Zhao, Nathan C. Boles, Justine D. Miller, Suzanne Kawola, Sally Temple, Richard J. Davis, Jeffrey H. Stern Development of a Refined protocol for trans – scleral subretinal transplantation of human retinal pigment epithelial cells into rat eyes. *Journal of Visualized Experiments*. (126), e55220.
12. Del Priore LV, Kaplan HJ, Tezel TH, Hayashi N, Berger AS, Green WR. Retinal pigment epithelial cell transplantation after subfoveal membranectomy in age-related macular degeneration: clinicopathologic correlation. *Am J Ophthalmol*. 2001; 131 (4): 472–480.
13. Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology*. 2003; 110 (5): 979–986.
14. van Meurs JC, Eter Averst, Hofland LJ, van Hagen PM, Mooy CM, Baarsma GS et al. Autologous peripheral retinal pigment epithelium translocation in patients with subfoveal neovascular membranes. *Br J Ophthalmol*. 2004; 88: 110–113.
15. Nita M, Strzalka-Mrozik B, Grzybowski A, Romaniuk W, Mazurek U. Ophthalmic transplantology: posterior segment of the eye – part II. *Med Sci Monit*. 2012; 18 (6): RA97–103.
16. Schmidt-Erfurth U, Hasan T, Gragoudas E, Michaud N, Flotte TJ, Birngruber R. Vascular targeting in photodynamic occlusion of subretinal vessels. *Ophthalmology*. 1994; 101 (12): 1953–1961.
17. Yannuzzi LA, Friedman R, Fine SL, Gass JD, Gitter KA, Orth DH, Singerman LJ. Symposium on age-related macular degeneration. *Bull N Y Acad Med*. 1988; 64 (9): 955–1013.

Статья поступила в редакцию 20.02.2019 г.
The article was submitted to the journal on 20.02.2019