

SISTEME TEHNOLOGICE INOVAȚIONALE ÎN PRELEVAREA ȘI PROCESAREA CORNEEI

Adrian COCIUG¹, Olga MACAGONOVA²,
Lilia DUMBRĂVEANU³, Valeriu CUȘNIR³, Viorel NACU²

¹Banca de țesuturi umane, Chișinău, Republica Moldova,

²Laboratorul de Inginerie Tisulară și Cultură Celulară, USMF

„Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova,

³Catedra de oftalmologie și optometrie, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

[https://doi.org/10.52556/2587-3873.2022.1\(92\).05](https://doi.org/10.52556/2587-3873.2022.1(92).05)

Rezumat

Dispozitivele și instrumentariul folosite în prelevarea și procesarea corneei sunt și vor fi una din necesitățile folosite de Banca de ochi. Analiza aparatajului și instrumentariului modern pentru prelevarea și procesarea corneei necesită un progres tehnologic și informațional ce tinde să modernizeze toate tipurile de dispozitive pentru a spori calitatea corneei, ceea ce permite o stocare ex vivo mai îndelungată, menținând în același timp viabilitatea straturilor corneei la nivel epitelial, stromal și endotelial. Bioreactoarele sunt dispozitive complexe care mențin depozitarea corneei ex vivo care sunt mai aproape de norma fiziologică. Multe studii arată că aceste dispozitive direct sau indirect influențează activitatea celulelor.

Cuvinte-cheie: celule endoteliale, mediu de cultură, presiune intraoculară, celule epiteliale, stromă, bioreactor, bancă de ochi

Summary

Innovative technological systems in cornea collection and processing

The devices and tools used in the cornea sampling and processing is and will be one of the requirements used by the Eye Bank. Analysis of modern corneal sampling and instrumentation requires technological and informational progress that tends to modernize all types of devices to induce increased corneal quality that provides longer ex vivo storage while maintaining the viability of corneal layers at the epithelial, stromal, and endothelial levels. Bioreactors are complex devices that maintain the storage of the cornea ex vivo that are closer to the physiological norm. Many studies show that the materials that are made of these devices directly or indirectly influence the activity of the cells.

Keywords: endothelial cells, culture medium, intraocular pressure, epithelial cells, stroma, bioreactor, eye bank

Резюме

Инновационные технологические системы в сборе и обработке роговицы

Устройства и инструменты, используемые для взятия проб и обработки роговицы, являются и будут одним из предметов первой необходимости, используемых Глазным банком. Анализ современных образцов роговицы и инструментов требует технологического и информационного прогресса, направленного на модернизацию всех типов устройств для повышения качества роговицы, что обеспечивает более длительное хранение ex vivo при сохранении жизнеспособности слоев роговицы на эпителиальном, стромальном и эндотелиальном уровнях. Биореакторы представляют

собой сложные устройства, поддерживающие запасы роговицы ex vivo, близкие к физиологической норме. Многие исследования показывают, что эти устройства прямо или косвенно влияют на активность клеток.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, питательная среда, внутриглазное давление, эпителиальные клетки, строма, биореактор, глазной банк

Introducere

Corneea reprezintă fereastra ochiului nostru, permițând luminii să ajungă la celulele senzoriale și face posibilă vizualizarea lumii înconjurătoare. La om, ea are o grosime de 0,5 mm, un diametru de 10-12 mm, o formă sferică ce formează o putere refractivă a ochiului de 43 dioptrii. Din cauza leziunilor corneene sau a tulburărilor regenerative, infecțioase, distrofice și inflamatorii, numeroase boli ale corneei duc la opacitate și orbire. Actualmente, aproximativ 5,2 milioane de persoane au vederea afectată. Corneea este printre cele mai reușite țesuturi transplantate [1]. Cu toate acestea, lipsa unui număr suficient de grefe corneene creează rânduri de așteptare, în special în țările în curs de dezvoltare [2]. Mai mult, numărul donatorilor este în scădere din cauza schimbărilor demografice și a frecvenței tot mai mari a intervențiilor chirurgicale pe cornee. Creșterea numărului de transplanturi de cornee necesită recrutarea mai multor donatori și stocarea țesuturilor corneene pentru o perioadă de timp mai mare de 30 de zile [3].

Studierea corneei care are la bază menținerea viabilității celulare cu păstrarea transparenței este una din provocări pentru cercetători. Aceștia tind mereu să implimenteze diverse metode și dispozitive necesare pentru diverse etape de prelevare și procesare a corneei care fac ca etapele date să fie mai ușoare, de scurtă durată ce mențin maximal durata de viață a celulelor straturilor corneei [4].

Scopul

Evaluarea aparatajului și instrumentariului modern pentru prelevarea și procesarea corneei.

Obiective

Crearea unor instrumentarii și dispozitive inovaționale moderne utilizate la toate etapele de prelevare și procesare a corneei.

Evaluarea aplicării dispozitivelor inovaționale la calitatea morfologică a corneei.

Determinarea unor sisteme tehnologice moderne în conservarea corneei (reviul literaturii).

Evaluarea influenței dispozitivelor și instrumentariului modern în mărirea duratei de conservare și calitatea morfologică ale corneei.

Materiale și metode

Instrumentariul brevetat a fost folosit în diverse etape de prelevare și procesare a corneei în BȚCU, în perioada 2013–2021, la 312 corneei de la 156 de donatori (69,8% bărbați, 30,2% femei), cu vârste cuprinse între 18 și 91 de ani, media de vârstă fiind 59,4 de ani. Corneele au fost prelevate de la donatorii din Centrul de medicină legală (23,5%), spitale publice autorizate (67,6%) și donatori de organe (7,1%). Cele mai frecvente cauze ale deceselor donatorilor au fost bolile cardiovasculare, traumatismele și bolile cerebrovasculare. Timpul de păstrare a crescut de la 3,5 la 11,8 zile, de când mediul de cultură a înlocuit depozitarea hipotermică. Corneea a fost invalidată în 22,8% din cazuri, care au fost determinate de infecții serologice - HBsAg-pozitiv, HCV-pozitiv, HIV/SIDA – (15%) și de contaminarea biologică (7,8%). În total, 77,2% din țesutul corneean prelevat au fost folosite pentru transplant de cornee (74,8% pentru keratoplastie penetrantă, 2,1% pentru keratoplastie lamelară și 1,3% pentru transplanturi nespecificate) și 22,8% au fost distruse.

La etapa de prelevare, s-a inventat în cadrul Laboratorului de inginerie tisulară și culturi celulare diverse dispozitive, unul din ele fiind „Dispozitiv de secționare a corneei” (figurile 1 și 2) [5], care permit secționarea corneei într-o etapă fiind confecționat din inox. Acest dispozitiv este eficient, deoarece poate fi folosit, reutilizat și este ușor de sterilizat.

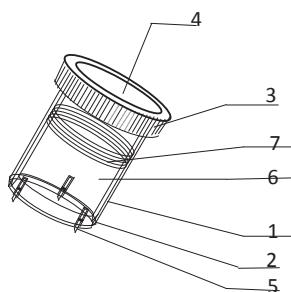


Figura 1.

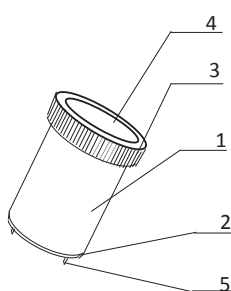


Figura 2.

Figurile 1 și 2. Dispozitiv pentru secționarea corneei, Brevet MD1048

Sursa: Cociug A., Macagonova O., Nacu V.: Patent. (MD) 1048. Device for cutting of the cornea. BOPI, nr. 6/2016, p.34.

La etapa de procesare a corneei în cadrul Băncii de țesuturi umane din Republica Moldova sunt fo-

losite o serie de dispozitive utilizate, care au ca scop modelarea corneei și înlăturarea detriturilor pentru a mări rezistența la infecțiile bacteriene și fungice. Unul din acestea este dispozitivul de fixare a corneei (figurile 3 și 4) [6].

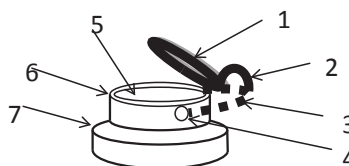


Figura 3.

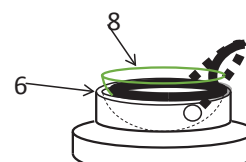


Figura 4.

Figurile 3 și 4. Dispozitiv pentru fixarea corneei, Brevet MD1504

Sursa: Cociug A., Macagonova O., Nacu V.: Patent number 1504 MD. Cornea fixation device. BOPI, nr. 2/2021, p.52.

După procesare în sala curată din cadru Băncii de țesuturi umane (BȚU), urmează etapa de evaluare morfologică a integrității stratului epitelial, opacității și transparenței corneei. Numărul celulelor endoteliale se efectuează cu ajutorul microscopului cu contrast de fază inversată la care corneea se amplasează în „Vas pentru numărarea celulelor endoteliale ale corneei” (figura 5) [7], care este umplut cu mediu de cultură Tissue „C”. Corneea se scufundă în acest vas cu concavitatea în jos și sub microscopul cu contrast de fază inversată fiind ușor cuantificată media celulelor endoteliale.

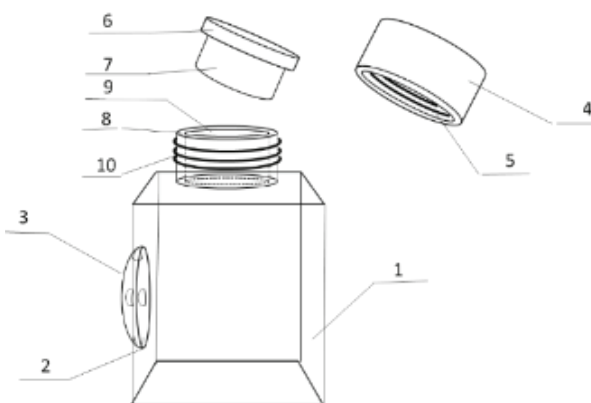


Figura 5. Dispozitiv pentru conservarea și examinarea celulelor endoteliale ale corneei, Brevet MD1311

Sursa: Cociug, A Macagonova O., Nacu V.: 1311 MD Device for corneal preservation and examination of endothelial cells of the cornea. BOPI, nr. 2/2019, p. 51.

Stocarea corneelor în diverse medii de cultură cu mărirea viabilității celulare mai mare de 30 de zile, rămâne una din problemele nerezolvate până în prezent.

Actualmente, se cunosc dispozitive care îndeplinesc funcția similară a globului ocular ce mențin

suprafața superioară a corneei în mediu bogat cu CO₂ ce induce proliferarea celulelor epiteliale și păstrarea viabilității celulelor endoteliale. Aceste dispozitive sunt bioreactoarele, ce prezintă un sistem complex automatizat care schimbă permanent mediile de nutriție ale celulelor corneei. Unul din bioreactoare este proiectat în SolidWorks (Dassault Systemes Soli Works Corp, Waltham, SUA). Coroanele bioreactorului sunt frezate din oțel inoxidabil, iar corpul din polisulfonă, prin 3D printare. Materialul pentru tipărirea 3D este un polimer biocompatibil acrilat-ba sed (Universitatea Tehnică München, Germania) (schema 1). S-a stabilit că schimbarea mediului de cultură, autoclavarea și pregătirea suprafeței materialelor sunt factori importanți care influențează viabilitatea celulară. Poli (eteretercetonă) și titan-6Al-4V s-au dovedit a fi cele mai potrivite materiale pentru utilizarea într-un sistem de bioreactoare pentru cornee.



Schema 1. Cultura dinamica a corneei native.

A) O corneă a fost fixată într-un bioreactor utilizând un fixator personalizat. Sistemul bioreactor combinat din două circuite separate. Circuitul 1 cu pompa P1 a furnizat mediu către partea endotelială a corneei; în circuitul 2, pompa P2 a livrat mediu în partea epitelială a corneei pentru a imita lichidul lacrimal. Senzorul PI a măsurat presiunea intraoculară.

Acest bioreactor este implicat doar în studiu științific, drept material biologic fiind ochii de porcină care au caractere similare după mărime și structura straturilor corneei cu cele umane.

Ochii au fost transferați direct în mediu DMEM (Invitrogen, Darmstadt, Germania) cu 10% ser fetal de vițel (Lonza, Colog ne, Germania) și 1% Penicilină / Streptomycină (PAA, Coe lbe, Germania).

Corneea amplasată cu fața concavă pe suprafața coroanei (foto 1.) se fixează ermetic în care suprafața

convexă permite a forma o presiune ridicată similară cu cea în camera anterioară a globului ocular, iar suprafața convexă formează cameră care conține CO₂ și picături similare cu conținutul lacrimii (brevet pentru picăturile de ochi (US8648057 B2) ce conține concentrație sporită de calciu avînd efect pozitiv asupra creșterii epiteliale. În corpul bioreactorului sunt diverse medii de cultură cel mai potrivit fiind mediu biocrom 1 (MerckBiochrom GmbH, Berlin, Germania). Această combinație de mediu oferă condiții optime de mediu pentru epiteliu și endotelium.



Foto 1. Masa de fixare a corneei în bioreactor.

Un alt bioreactor care studiază corneea este elaborat în Franța, Quantel Medical Laboratory (figura 8.), și permite studierea celor trei straturi, presiunii din interiorul camerei anterioare a globului ocular și determinarea compoziției biochimice la umflarea straturilor după scufundarea corneei în diverse medii.

S-a determinat că controlul formei, transparenței și grosimii corneei necesită o pompă endotelială, integritate epitelială, în special cu joncțiuni etanșe, continue între cele mai superficiale celule și presiunea intraoculară normală (PIO). Această presiune de umflare (SP) (60 mm Hg la oameni și porcine) este contrabalansată de PIO (15 ± 5 mm Hg), care împinge constant suprafața corneei posterioare înainte și de refluxul constant de apă prin pompa endotelială. Această pompă controlează presiunea de imbibiție (IP), iar echilibrul poate fi rezumat prin ecuația $IP = IOP - SP$ [8]. După decesul donatorului și cu atât mai mult după excizia corneei, pierderea IOP și pierderea gradată concomitentă a funcției de pompare endotelială explică umflarea rapidă a corneei. Mai mult, conservarea celulelor epiteliale ale corneei și a celulelor stem epiteliale limbale necesită un mediu de cultură specific, expunere intermitentă la aer [9], și eventual stres după secționarea corneei cu instrumentele chirurgicale [10].

Bioreactorul aplică principiile camerelor de perfuzie descrise anterior și ale camerelor artificiale anterioare, [11-17], (foto 2). A fost conceput pentru a menține un mediu închis steril care să permită depozitarea pe termen lung. Corneea este strâns fixată la baza bioreactorului, folosind janta sclerală pentru a separa camerele epiteliale și endoteliale; fiecare cameră este conectată la un sistem distinct de control al mediului de cultură. O pompă peristaltică este controlată de un senzor de presiune și un analizator reînnoiește continuu mediul de cultură (MC) la o rată de 5 μ L / minut, creând în același timp o presiune cu 20 mm Hg mai mare decât presiunea atmosferică în camera endotelială. MC pentru corneea conține 2% ser fetal de vițel (CorneaMax; Eurobio, Les Ulis, Franța). Camera epitelială este conectată la o pompă peristaltică controlată de un microanalizator, alternând expunerea epitelului la aer și imersiunea într-un MC (denumit în continuare „ridicare de aer”). Acest bioreactor (BR) are două ferestre transparente, de fiecare parte a corneei, ce permite controlul optic în timpul experimentelor. BR a fost conceput pentru a fi compatibil cu sistemele de imagistică oftalmologică actuale, cum ar fi lampa cu fantă, sistemele de tomografie cu coerență optică (OCT) și microscopia speculară. Sistemul complet, cu excepția panourilor sale de control, a fost plasat într-un incubator uscat cu 5% CO₂ la 31°C.

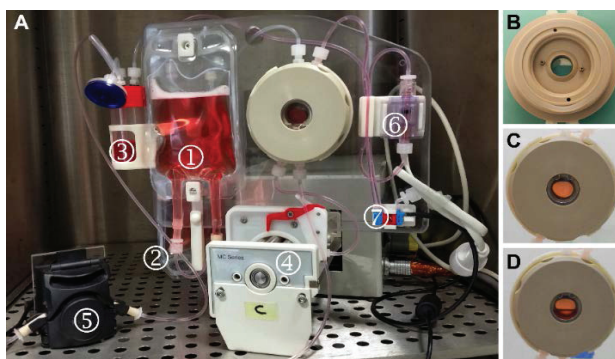


Foto 2. Structura generală al bioreactorului în incubator cu CO₂.

Rezultate și discuții

Dispozitivele și instrumentariul folosit în prelevările și procesarea corneei este și va fi una din necesități folosite de Banca de ochi. Progresul tehnologic și informațional tinde a moderniza toate tipurile de dispozitive ce induce la sporirea calității corneei ce oferă o stocare ex vivo mai îndelungată cu păstrarea viabilității straturilor corneei la nivel epitelial, stromal și endotelial mai aproape de norma fiziologică. Multe studii arată că aceste dispozitive direct sau indirect influențează activitatea celulelor. Cele mai aproape de parametrii globului ocular ale

omului sunt corneele de porcină cu vârsta de 6 luni, ce au aceleași mărimi și structuri celulare. O deosebire este doar structura arhitectonică a stromei care este mai bogată în fibre reticulare la om ce configurează forma globului ocular [19]. La porcine, ele sunt mai mici datorită reticulării neenzimatică legate de vârstă, ce afectează fibrilele de collagen stromal [20]. Doar la menținerea în medii de cultură cu hidratarea straturilor ele revin la forma normală. În plus, umflarea corneei începe imediat după secționarea sclerei (+70 μ m în prezentul studiu), sugerând că micșorarea fibrelor elastice de collagen tensionate natural joacă un rol în creșterea grosimii.

Corneele porcine sunt stocate timp de 7 zile în BR cu 20 mm Hg în camera endotelială. Aici se face reînnoirea continuă a mediului de cultură și ridicarea aerului epitelial păstrând parametrii apropiați de cei ale corneei postmortem pentru fiecare dintre cele trei straturi: epitelial, stromal și endotelial.

Corneele de porcină disponibile de la abatoare au în medie 6 luni și sunt mult mai puțin rigide decât corneele umane [18] după excizia corneo-sclerală. Corneea porcină își pierde forma, spre deosebire de corneea umană.

Edemul stromal masiv observat în BR numai cu corneea fără iris creează o cale de intrare anormală pentru apă atunci când IOP este restabilit. În special, acest fenomen nu a fost observat în OC (corneea optică), deoarece lipsea un gradient de presiune. Dimpotrivă, când se păstrează anatomia unghiului iridocorneal, presiunea restabilită în BR compensează parțial SP și astfel limitează semnificativ umflarea stromală. Tumefierea corneei este, de asemenea, limitată de integritatea barierei epiteliale datorate joncțiunilor strânse în celulele epiteliale cele mai superficiale. Corneele stocate rămân astfel subțiri fără adăugarea de macromolecule, utilizate în mod obișnuit de băncile de ochi în OC convenționale, pentru a crește osmolaritatea medie. Acest rezultat poate avea aplicații pentru Băncile de ochi, deoarece mediile de dezintegrare hiperosmolare folosite în timpul stocării corneei pot fi toxice pentru endoteliu [21, 22]. În plus, reducerea pliurilor endoteliale legate de edemul corneean este probabil să reducă pierderile epitelului cornean (EC), având în vedere relația dintre pliurile endoteliale și apoptoza EC [23, 24]. În plus, reînnoirea continuă a MC în BR ar putea îmbunătăți, de asemenea, supraviețuirea EC.

În plus, sistemul de ridicare a aerului din camera epitelială ar putea induce o tensiune de forfecare asupra limbusului care ar putea fi implicată în reglarea celulelor stem epiteliale. Diferențierea celulelor epiteliale este într-adevăr influențată de prezența celulelor endoteliale [25]. Au fost raportate cazuri

de deficiență a celulelor stem limbale secundare unei disfuncții endoteliale severe, ceea ce susține și ipoteza interacțiunilor endotelium-epitelium [26].

În plus, prezentul studiu arată că BR este o platformă experimentală inovatoare. Permite stocarea corneei în condiții sterile, dar și vizualizarea directă a țesuturilor prin ferestre transparente, fără a întrerupe experimentul. Măsurătorile optice endoteliale și evaluarea transparenței pot fi astfel realizate in situ. Presiunea în interiorul camerei endoteliale poate fi ajustată dacă este necesar, iar mediul care scaldă endoteliul și epiteliumul poate fi diferit și poate avea debiteuri reglabile separat, ca în prezentul studiu. În plus, probele mediului pot fi colectate cu ușurință în diferite puncte ale circuitului pentru analize specifice.

Prin restabilirea unui mediu fiziologic apropiat corneei (IOP, flux, ridicare epitelială a aerului, MC specifică pentru fiecare parte), această versiune BR păstrează corneele porcine timp de 1 săptămână în condiții care nu au fost atinse anterior, cu o supraviețuire EC excelentă, grosime redusă, formă întreținerea și integritatea epiteliumului și limbusului. Deși este încă în curs de dezvoltare, acest model ar putea fi folosit pentru experimentele preclinice. Cercetările sunt în curs pentru a prelungi durata de depozitare și pentru a crea un test patognomonic de vindecare a leziunilor corneene.

Concluzii

Dispozitivele folosite la etapele de prelevare cât și la cele de procesare prezintă unul din elementele de bază care facilitează și garantează calitatea morfologică a corneei.

Folosirea vasului pentru conservarea corneei și calcularea celulelor endoteliale ale corneei permite păstrarea sterilității corneei până la etapa de transplantare.

Bioreactoarele sunt dispozitive moderne ce mențin corneea în mediu apropiat de cel fiziologic, necesar pentru keratoplastie transfixiantă și lamelară.

Modernizarea bioreactoarelor este una din căile principale de a conserva viabilitatea celulelor endoteliale timp mai îndelungat.

Actualmente nu există nici o metodă sau dispozitiv care ar păstra corneele mai mult de 30 zile cu un număr mai mare de 2000 celule endoteliale viabile la mm².

Mediile de cultură utilizate în băncile de ochi au fost dezvoltate acum mai bine de 30 de ani și ar trebui revizuite pentru a beneficia de progresul în biologia celulară și fiziologie.

Bibliografie

1. Resnikoff D., Pascolini D., Etyaale I., Kocur R., Pararajasegaram G.P., Pokharel S.P., Mariotti B. Global data on visual impairment in the year 2002. World Health Organization. 2004, 82, 844.
2. Armitage W. Interventions Implemented to Reduce the Risk of Transmission of Bacteria by Transfusion in the English National Blood Service. *J. Transfus. Med. Hemoth.* 2011, 38, 143.
3. Roeck T., Hofmann J., Thaler S., Bramkamp M., Bartschmidt K. U., Yoeruek E., Rock D., Organ transplantation scandal influencing corneal donation rate. *Arch. Clin. Exp.* 2016, 254, 135.
4. Cociug, A., Macagonova, O., Cusnir, V. Jr., Cusnir, V., and Nacu, V. Evaluation of the endothelial cell regenerative properties of the cornea in the culture media. results and prospects. 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering Proceedings of ICNBME-2019, September 18–21, 2019, 601-605.
5. Cociug, A., Olga, Macagonova, O., Nacu, V.: Patent. (MD) 1048. Device for cutting of the cornea. BOPI, nr. 6/2016, p.34.
6. Cociug, A., Olga, Macagonova, O., Nacu, V.: Patent number 1504 MD. Cornea fixation device. BOPI, nr. 2/2021, p.52.
7. Cociug, A., Olga, M., Nacu, V.: 1311 MD Device for corneal preservation and examination of endothelial cells of the cornea. BOPI, nr. 2/2019, p. 51.
8. Bryant, M.R., McDonnell, P.J. A triphasic analysis of corneal swelling and hydration control. *J Biomech Eng.* 1998; 120: 370–381.
9. Massie, I., Levis, H.J., Daniels, J.T. Response of human limbal epithelial cells to wounding on 3D RAFT tissue equivalents: effect of airlifting and human limbal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2014; 127: 196–205.
10. Kang, Y.G., Shin, J.W., Park, S.H., et al. Effects of flow-induced shear stress on limbal epithelial stem cell growth and enrichment. *PLoS One.* 2014; 9: e93023.
11. Piehl, M., Gilotti, A., Donovan, A., DeGeorge, G., Cerven, D. Novel cultured porcine corneal irritancy assay with reversibility endpoint. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24: 231–239.
12. Dikstein, S., Maurice, D.M. The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *J Physiol.* 1972; 221: 29–41.
13. Hull, D., Green, K., Boyd, M., Wynn, H. Corneal endothelium bicarbonate transport and the effect of carbonic anhydrase inhibitors on endothelial permeability and fluxes and corneal thickness. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977; 16: 883–892.
14. Brunette, I., Nelson, L.R., Bourne, W.M. A system for long-term corneal perfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30: 1813–1822.
15. Tanelian, D.L., Bisla, K. A new in vitro corneal preparation to study epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33: 3024–3028.
16. Thiel, M.A., Morlet, N., Schulz, D., et al. A simple corneal perfusion chamber for drug penetration and toxicity studies. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85: 450–453.
17. Zhao, B., Cooper, L.J., Brahma, A., et al. Development of a three-dimensional organ culture model for corneal wound healing and corneal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 2840–2846.

18. Elsheikh, A., Alhasso, D., Rama, P. Biomechanical properties of human and porcine corneas. *Exp Eye Res.* 2008; 86: 783–790.
19. Hatami-Marbini, H., Etebu, E., Rahimi, A. Swelling pressure and hydration behavior of porcine corneal stroma. *Curr Eye Res.* 2013; 38: 1124–1132.
20. Elsheikh, A., Wang, D., Brown, M., et al. Assessment of corneal biomechanical properties and their variation with age. *Curr Eye Res.* 2007; 32: 11–19.
21. Borderie, V.M., Baudrimont, M., Lopez, M., Carvajal, S., Laroche, L. Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. *Cornea.* 1997; 16: 215–223.
22. Thuret, G., Manissolle, C., Campos-Guyotat, L., Guyotat, D., Gain, P. Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 816–822.
23. Albon, J., Tullo, A.B., Aktar, S., Boulton, M.E. Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 2887–2893.
24. Gain, P., Thuret, G., Chiquet, C., et al. Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86: 306–310.
25. Pai, V.C., Glasgow, B.J. MUC16 as a sensitive and specific marker for epithelial downgrowth. *Arch Ophthalmol.* 2010; 128: 1407–1412.
26. Uchino, Y., Goto, E., Takano, Y., et al. Long-standing bullous keratopathy is associated with peripheral conjunctivalization and limbal deficiency. *Ophthalmology.* 2006; 113: 1098–1101.

Adrian Cociug, dr. șt. med., as. univ.,
medic Banca de țesuturi umane,
tel.:+373 79741902
e-mail: adriancociug77@gmail.com

Aplicat pentru publicare: 05.02.2022
Acceptat spre publicare: 18.04.2022