

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ РОГОВИЧНОЙ ЛЕНТИКУЛЫ

Борзенок С.А., Костенев С.В., Дога А.В., Ли В.Г., Островский Д.С., Хубецова М.Х.

ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Федорова» МЗ РФ, Москва, e-mail: inferno_03@mail.ru

Существующий на сегодня выраженный дефицит донорского материала при лечении различных патологий роговицы обуславливает поиск новых альтернативных методов лечения. Технологии тканевой инженерии, а именно метод децеллюляризации стромальной лентикулы, полученной в ходе рефракционной операции ReLEx SMILE, представляется перспективным направлением, который позволит эффективно применять выделенные лентикулы. Целью данной работы был поиск эффективного протокола децеллюляризации лентикулы с сохранением ее уникальных морфофункциональных характеристик. Материалы и методы. Критерием выбора для лентикулы являлись такие параметры, как толщина (121-148 мкм) и диаметр 6,5 мм. Для децеллюляризации использовали 2 протокола: 1) обработка 1,5 М хлоридом натрия с нуклеазами (NaCl); 2) обработка раствором трипсин-ЭДТА с последующем промыванием в гипотоническом трис-буфере с нуклеазами (трипсин-ЭДТА). Для определения качества децеллюляризации полученного тканеинженерного конструктора использовали окрашивание гематоксилином и эозином, количественный анализ содержания ДНК. Для определения оптических свойств лентикулы использовали метод спектрофотометрии, в качестве контроля служили лентикулы до децеллюляризации. Результаты. Оба протокола децеллюляризации были эффективны как в отношении удаления клеточного материала, так и оптимально низкого содержания ДНК. Однако при спектрофотометрии было выявлено значительное снижение прозрачности лентикул после обработки раствором трипсин-ЭДТА. При использовании NaCl прозрачность лентикул была приближена к контролю. Заключение. Использование протокола децеллюляризации NaCl представляется эффективным для создания тканеинженерного конструктора и последующего применения в лечении патологий роговицы.

Ключевые слова: лентикула, децеллюляризация, тканевая инженерия, роговица.

APPLICATION OF THE PROTOCOL DECELLULARIZATION FOR CORNEAL LENTICULES

Borzenok S.A., Kostenev S.V., Doga A.V., Li V.G., Ostrovskiy D.S., Khubetsova M.K.

S.N. Fyodorov NMRC Eye Microsurgery Federal State Institution of the Russian Ministry of Health, Moscow, e-mail: inferno_03@mail.ru

Today there is a pronounced shortage donor material for the treatment of various corneal pathologies, which leads to the search for new alternative methods of treatment. Tissue engineering technologies, such as the method of decellularization stromal lenticules obtained during the refractive surgery ReLEx SMILE, is a promising direction for the use of extracted lenticules. The aim of this study was to find an effective protocol decellularization of lenticules that retain their unique morphological and functional characteristics. Materials and methods. Inclusion criteria for the lenticule were such parameters as thickness (121 - 148 microns) and a diameter of 6.5. We used 2 decellularization protocols: 1) treatment with sodium chloride with nucleases (NaCl); 2) treatment with trypsin-EDTA solution followed by washing in hypotonic Tris buffer with nucleases (trypsin-EDTA). To qualitatively determine the decellularization of the obtained tissue-engineered construct, hematoxylin and eosin staining and quantitative analysis of the DNA content were used. To determine the optical properties of the lenticules, the spectrophotometry method was used; the control group consisted of fresh lenticules before decellularization. Results. Both decellularization protocols were effective both in removing cellular material and optimally reducing DNA content. However, spectrophotometry revealed a significant decrease in the transparency of the lenticules after treatment with a trypsin-EDTA solution. When using NaCl with nucleases, the transparency of the lenticules closed to the control. Conclusion. The application the protocol of decellularization NaCl is effective for creating a tissue-engineered construct and subsequent use in the treatment of corneal pathologies.

Keywords: lenticule, decellularization, tissue engineering, cornea.

Проблема дефицита донорских органов и тканей диктует необходимость развития направлений, связанных с созданием их искусственных эквивалентов. На сегодня тканевая

инженерия занимает одно из ведущих мест в регенеративной медицине и может рассматриваться в качестве альтернативы аллотрансплантации, в том числе и при кератопластике.

Нерешенные вопросы донорства, наряду с возрастающей потребностью в донорских органах и тканях, заставляют обратить внимание на децеллюляризацию как на перспективный метод получения биологических каркасов, последующая рецеллюляризация которых собственными стволовыми клетками реципиента позволит полностью восстановить структуру и функцию органа и/или ткани [1; 2]. Другим не менее перспективным направлением является использование амниотической мембраны, так, в недавнем исследовании была показана возможность применения конструкции на основе амниотической мембраны в качестве лечения тотального фиброваскулярного паннуса роговицы [3]. Островский Д.С. с соавт., используя методы тканевой инженерии, активно занимаются разработкой и созданием искусственной роговицы человека на основе полимерных материалов [4].

Децеллюляризация органов, то есть получение лишенного клеток межклеточного матрикса за счет перфузии с растворами детергентов, является одной из новых технологий в регенеративной медицине. Стоит отметить, что целью данного метода является сохранение состава, архитектуры и биологической активности межклеточного матрикса при полном удалении клеток и клеточных компонентов, что позволяет уменьшить риск отторжения тканей [5].

Операция под брендовым названием ReLEx SMILE является последним техническим достижением в рефракционной хирургии роговицы. В ходе данной операции с помощью фемтосекундного лазера внутри стромы роговицы формируется дискообразная лентикла, которая извлекается через небольшой разрез. Полученная в ходе операции лентикла остается невостребованной, вместе с тем было показано, что повторная имплантация роговичной лентиклы не только восстанавливает объем стромы роговицы, но и восстанавливает показатели аномалии рефракции после операции, как было продемонстрировано на моделях кроликов и обезьян [6; 7]. Также существуют сообщения о коррекции гиперметропии и кератоконуса с помощью имплантации интрастромальных лентикл [8-10].

В связи с вышеизложенным разработка методики децеллюляризации роговичной лентиклы представляется крайне актуальной.

В литературе существуют различные протоколы децеллюляризации, включающие в себя физические, химические и ферментативные методы [11]. Shafiq с соавт. в своей работе проводили сравнение различных протоколов децеллюляризации на цельных роговицах человека [12]. Согласно выводам авторов, децеллюляризация роговицы с использованием Тритон-Х 100, полиэтиленгликоля и жидкого азота не приводит к полному удалению

клеточного материала. Ацеллюлярный матрикс можно получить, используя протокол с додецилсульфатом натрия (SDS) и хлоридом натрия с нуклеазами. Данный протокол с натрием хлоридом и нуклеазами, как наиболее эффективный для рецеллюляризации стволовыми клетками, был заимствован китайскими учеными и успешно применен для получения ацеллюлярных стромальных лентикул в экспериментальной работе на животных [13].

Сингапурские ученые обрабатывали стромальные лентикулы изолированными растворами SDS, Тритон X-100, хлоридом натрия и их комбинациями с нуклеазами в разной концентрации [14].

Таким образом, в описанной литературе применение различных протоколов децеллюляризации лентикулы роговицы человека носит противоречивый характер, и единого стандартизованного протокола не существует.

Целью данной работы был поиск эффективного протокола децеллюляризации роговичной лентикулы с сохранением ее уникальных морфофункциональных характеристик.

Материал и методы исследования

Донорские лентикулы были получены при выполнении операции ReLEx SMILE.

Для использования лентикулы перед операцией у пациентов было получено добровольное информированное согласие. Средний возраст пациентов составлял $28,5 \pm 5,8$ года. Всем пациентам была выполнена операция SMILE по поводу миопии высокой степени и сложного миопического астигматизма (цилиндр до $-0,75$ дптр). Сферический эквивалент до операции SMILE составлял $-6,93 \pm 0,63$ дптр. Для методов децеллюляризации использовали лентикулы с толщиной 121-148 мкм и диаметром 6,5 мм.

Забор материала проходил в операционной на базе головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ. Операция по технологии ReLex SMILE проходила под местной капельной анестезией, с помощью фемтосекундного лазера VisuMax (частота следования импульсов 500 кГц, энергия в импульсе 160 нДж), формировались сначала дно лентикулы, а затем ее «крышка». Диаметр лентикулы составлял 6.5 мм, а диаметр крышки 7.5 мм. Лентикула переносилась во флакон, содержащий дисперсный вискоэластик (ДВ) массой 600.000 Дальтон, в состав которого входили 3,0% гиалуронат натрия 4,0% и хондроитин сульфат. Флакон с лентикулой помещался в специальный контейнер с гипотермическим режимом. Затем контейнер с образцами транспортировался на базу Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем головной организации МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова. Дальнейшая работа выполнялась *in vitro*, в стерильных условиях ($n= 30$).

Децеллюляризация лентикулы. Для процесса децеллюляризации использовали два варианта растворов, которые различались по компонентам, концентрации и времени

экспозиции. Таким образом, было сформировано три группы, где одна группа была контрольной, а две группы были опытными (таблица).

| № | Действующие компоненты | Описание методики |
|-------------------------|---|--|
| 1-я группа, контрольная | Нативные лентиккулы, n = 30 | |
| 2-я группа, опытная | 1,5 М NaCl + ДНКаза 5 Ед/мл и РНКаза 5 Ед/мл (NaCl) n = 15 | Инкубация в 1,5 М растворе хлорида натрия в течение 48 часов, с заменой раствора каждые 24 часа. Затем образцы инкубировали в растворе с ДНКазой 5 Ед/мл (Sigma-Aldrich) и РНКазой 5 Ед/мл (Sigma-Aldrich) в течение 48 часов. Далее образцы промывали в растворе PBS в течение 72 часов, с заменой каждые 24 часа. Процедура обработки проводилась при комнатной температуре и при непрерывном встряхивании в шейкере |
| 3-я группа, опытная | 0,25% Трипсин-ЭДТА + гипотонический трис-буферный раствор (рН 7.2) + ДНКаза 50 Ед/мл и РНКаза 1 Ед/мл + гипотонический трис-буферный раствор, рН 7.2 (Трипсин-ЭДТА) n = 15 | Инкубация в растворе 0,25% Трипсин-ЭДТА в течение 48 часов. Затем 1 час в гипотоническом растворе трис-буфера (рН 7.2). Далее в растворе с ДНКазой 50 Ед/мл и РНКазой 1 Ед/мл в течение 24 часов. В конце образцы отмывали в гипотоническом трис-буферном растворе (рН 7.2) в течение 1 часа. Процедура обработки проводилась при температуре 37 °С и при непрерывном встряхивании в шейкере |

Прозрачные свойства лентиккулы

Спектральное пропускание лентиккулы в диапазоне длины волн от 380 до 780 нм определяли с помощью спектрофотометра Multiskan GO (Thermo Scientific, США), данные собирались с шагом 10 нм. С целью дегидратации образцы обезвоживали в течение 1 часа в ДВ, далее их переносили в лунки 96-луночного планшета для измерения коэффициента пропускания $K_{п}$ (%). Для статистического анализа данных в качестве расчетного значения применяли суммарное среднее для всей группы по 41 точке прозрачности полученного спектра.

Для этого сначала был рассчитан K_0 , следующим образом:

$$K_0 = \frac{K_1}{K_2} * 100 \%,$$

где K_0 – коэффициент пропускания для каждой из 41 точек спектра в пределах одного образца в группе;

K_1 - коэффициент пропускания в лунке, содержащей образец;

K_2 - коэффициент пропускания в лунке, не содержащей образец.

Затем был рассчитан K_c следующим образом:

$$K_c = \frac{\sum K_o}{N},$$

где K_c – средний коэффициент пропускания для каждой из 41 точек спектра всех образцов в группе;

$\sum K_o$ – суммарное значение измерений каждого образца в группе;

N = общее количество образцов в группе.

Далее был рассчитан K_{Π} следующим образом:

$$K_{\Pi} = \frac{\sum K_c}{41},$$

где K_{Π} – коэффициент пропускания для всех точек спектра группы в целом (41 точка);

$\sum K_c$ – суммарное значение среднего коэффициента пропускания;

41 - общее количество точек спектра.

Гистологическая оценка нативных и децеллюляризованных лентикул

Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, промывали проточной водой, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин, выполняли серии гистологических срезов толщиной 2-3 мкм с применением окрасок гематоксилином-эозином. Препараты изучали на инвертированном микроскопе «ix81 Olympus» при 40-кратном увеличении с последующим фотографированием.

Количественное определение ДНК

Для измерения содержания ДНК было использовано по 10 образцов из каждой группы. Для выделения ДНК использовался набор DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Подсчет содержания ДНК осуществлялся с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) и набора для анализа Qubit dsDNA HS (High-Sensitivity) Assay Kit (Invitrogen, США). Процедура измерения производилась согласно инструкции производителя.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием среды для статистических вычислений R версии 4.0.2. (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия), а визуализацию данных при помощи программы GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., США). Нормальность распределения переменных оценивалась с использованием теста Шапиро-Уилка. Гомогенность дисперсий оценивалась с помощью теста Бартлетта. Данные представлены в виде среднего со стандартным отклонением ($M \pm SD$) и медианы с межквартильным размахом (Me (1-3 квартили)).

Для сравнения прозрачности лентикул в рамках одного протокола обработки был использован критерий Уилкоксона и Т-критерий Стьюдента для парных и зависимых выборок. Сравнивались связанные выборки в двух разных точках, например контроль-протокол. Сравнение независимых выборок проводилось с помощью критерия Краскела-Уоллиса с последующим post-hoc тестом Данна или t-критерием Уэлча для ненормально и нормально распределенных выборок (с гетерогенными дисперсиями) соответственно. Во всех случаях была использована поправка Холма на множественные сравнения. При оценке результатов статистически значимыми считали результаты при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Как видно из рисунка 1, в группах обработки Трипсином значительно снижена прозрачность по сравнению с контролем, а наиболее приближен к контролю был протокол с использованием NaCl. Проведенный анализ выявил статистически значимые различия в группах NaCl-Контроль ($87,67 \pm 1,87$ против $94,11 \pm 1,23$; ($87,76$ ($86,96-88,95$)) против ($94,37$ ($93,39-95,03$))); $p < 0,0001$); Трипсин-ЭДТА - Контроль ($62,66 \pm 7,53$ против $86,55 \pm 5,74$; ($64,88741$ ($55,87-66,61$)) против ($85,99$ ($83,47-91,41$))); $p < 0,0001$); также при сравнении NaCl-Трипсин-ЭДТА ($87,67 \pm 1,87$ против $62,66 \pm 7,53$; ($87,76$ ($86,96-88,95$)) против ($64,88741$ ($55,87-66,61$))); $p < 0,0001$).

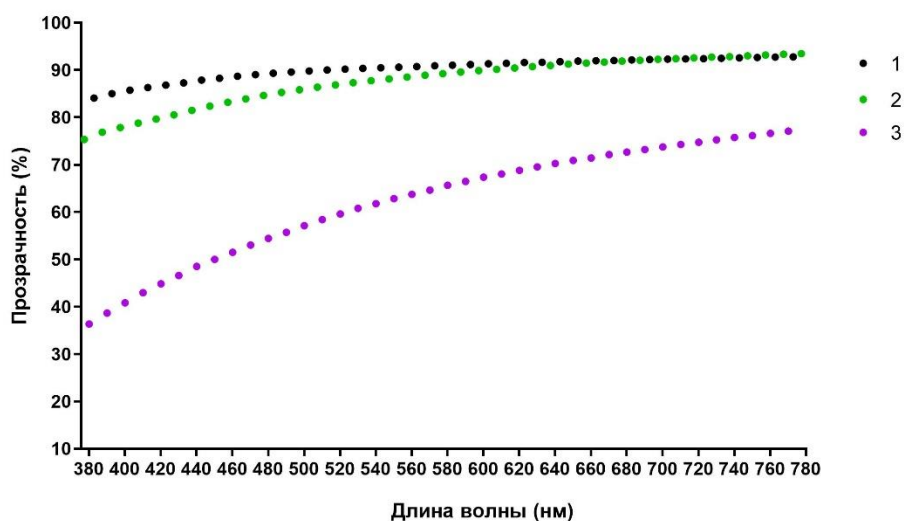


Рис. 1. Среднее спектральное пропускание (%) на длинах волн от 380 до 780 нм:
1 - контрольная группа ($n=30$), 2 - NaCl ($n=15$), 3 - Трипсин-ЭДТА ($n=15$)

Как видно из рисунка 2, содержание ДНК в группах после обработки уменьшилось, что соответствовало стандартному требованию меньше 50 нг ДНК на мг сухого веса. Особенно заметно значительное снижение в группе Трипсин. При попарном сравнении групп t-критерием Уэлча (с поправкой Холма) было выявлено статистически значимое отличие между всеми группами: NaCl-Контроль ($39,34 \pm 8,65$ против $132,18 \pm 44,17$; ($41,99$ ($38,57-44,67$)) против ($128,5$ ($102,02-154,48$))); $p < 0,0002$); Трипсин-ЭДТА-Контроль ($13,42 \pm 7,4$ против $132,18 \pm 44,17$;

(11,45 (8,47-16,86)) против (128,5 (102,02-154,48)); $p < 0,0001$); NaCl- Трипсин-ЭДТА (39,34±8,65 против 13,42±7,4; (41,99(38,57-44,67)) против (11,45 (8,47-16,86)); $p < 0,0001$).

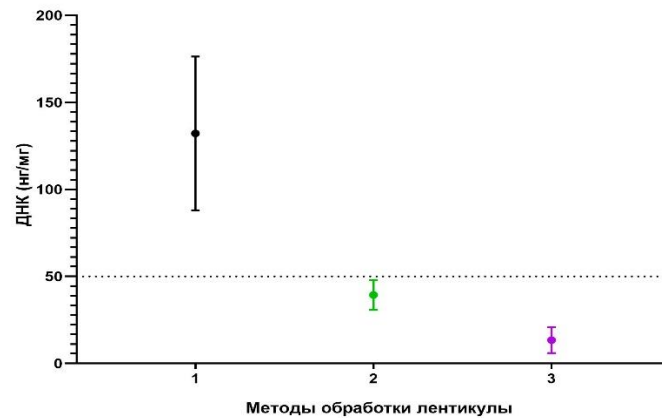


Рис. 2. Измерение количественного содержания ДНК (нг/мг) в зависимости от метода обработки: 1 - контрольная группа ($n=10$), 2 - NaCl ($n=10$), 3 - Трипсин-ЭДТА ($n=10$)

Гистологически при окрашивании гематоксилином и эозином в контрольной группе отмечались сохранность архитектоники стромальной ткани и наличие зрелых кератоцитов, а в группе NaCl было выявлено полное удаление клеток на фоне отсутствия значительного повреждения структуры ВКМ. В группе Трипсин-ЭДТА заметно значительное повреждение ацеллюлярной стромы лентикулы (рис. 3).

| | | |
|----------|----------|----------|
| А | Б | В |
|----------|----------|----------|

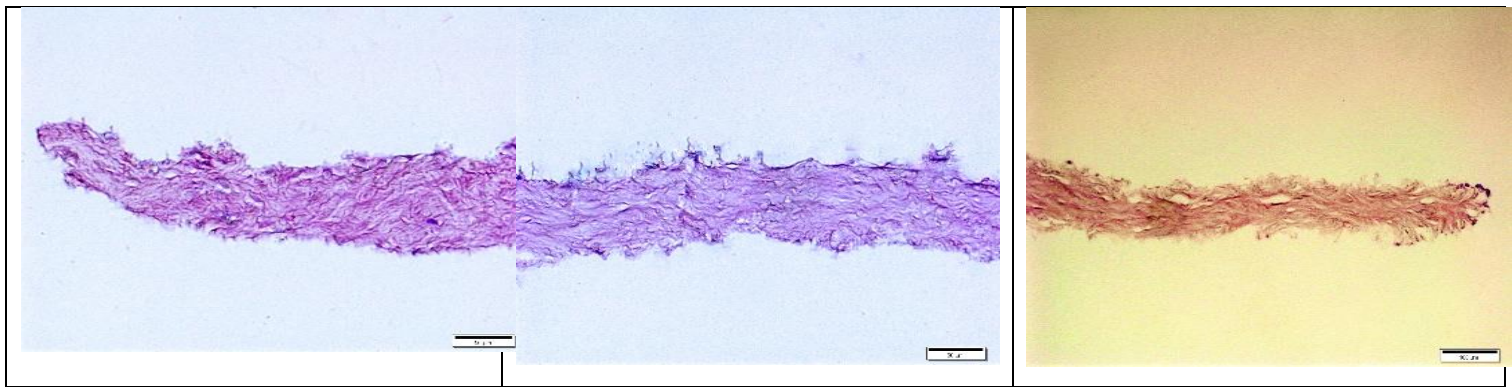


Рис. 3. Гистологическая картина лентикулы до и после обработки: А - контрольная группа (n=5), Б - NaCl (n=5), В - Трипсин-ЭДТА (n=5). Окрашивание гематоксилином и эозином, x40

Все протоколы децеллюляризации были эффективны как в отношении удаления клеточного материала, так и оптимально низкого содержания ДНК. Эти данные согласуются с данными Nuh M.I. и др., которые в своей работе определили, что 0,25% и 0,5% Трипсин-ЭДТА в сравнении с другими протоколами показали самое низкое содержание ДНК [15]. Кроме того, авторы также проводили оценку прозрачности методом спектрофотометрии, по результатам которых был сделан вывод, что лентикулы после обработки растворами 0,25% и 0,5% Трипсин-ЭДТА показали лучшие результаты среди других. В нашем исследовании группа 0,25% Трипсин-ЭДТА показала значительно низкие результаты прозрачности и при гистологическом окрашивании было отмечено значительное повреждение ацеллюлярного ВКМ. В литературе имеются сведения о разрушительном действии трипсина и нуклеаз на коллагеновую структуру тканей [16]. Основными требованиями, предъявляемыми для создания тканеинженерного конструкта роговицы (ТК), являются такие его свойства, как прозрачность и отсутствие иммуногенности, которые отражаются в сохранении коллагеновой структуры ВКМ и удаления клеточного материала. В нашем исследовании обработка NaCl обеспечила прозрачность, которая была приближена к контролю. При этом анализ содержания ДНК и общегистологическая структура ткани показали удовлетворительные результаты.

Заключение. Таким образом, представленный анализ сравнения эффективных протоколов децеллюляризации для лентикул толщиной 121-148 мкм и диаметром 6,5 мм, полученных при коррекции миопии высокой степени и сложного миопического астигматизма (до -0,75 дптр), констатировал целесообразность разработки и применения протокола NaCl, как наиболее эффективного для создания ТК. Однако следует учесть расхождения в существующей литературе и целесообразность продолжения работы в большем масштабе исследований.

Список литературы

1. Bonvillain R.W., Danchuk S., Sullivan D.E., Betancourt A.M., Semon J.A., Eagle M.E., Mayeux J.P., Gregory A.N., Wang G., Townley I.K., Borg Z.D., Weiss D.J., Bunnell B.A. A nonhuman primate model of lung regeneration: detergent-mediated decellularization and initial in vitro recellularization with mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A*. 2012. vol. 18. no. 23-24. P. 2437-2452. DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0594.
2. Ott H.C., Matthiesen T.S., Goh S.K., Black L.D., Kren S.M., Netoff T.I., Taylor D.A. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008. vol. 14. no. 2. P. 213-221. DOI: 10.1038/nm1684.
3. Александрова О.И., Гаврилюк И.О., Машель Т.В., Черныш В.Ф., Чурашов С.В., Куликов А.Н., Блинова М.И. К вопросу о подготовке амниотической мембраны в качестве скаффолда для культивируемых клеток при создании биоинженерных конструкций роговицы // Саратовский научно-медицинский журнал. 2019. № 15 (2). С. 409–413. [Электронный ресурс]. URL: <http://ssmj.ru/2019/2/409> (дата обращения: 20.02.2021).
4. Островский Д.С., Борзенко С.А., Агапов И.И., Хубецова М.Х., Желтоножко А.А. Возможность применения полимерных материалов различного дизайна при создании передних слоев стромы искусственной роговицы // Современные технологии в офтальмологии. 2020. № 4 (35). С. 260-261. DOI: 10.25276/2312-4911-2020-4-260-261.
5. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011. vol. 32. no. 12. P. 3233-3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.0572.
6. Angunawela R.I., Riau A.K., Chaurasia S.S., Tan D.T., Mehta J.S. Refractive lenticule re-implantation after myopic ReLEx: a feasibility study of stromal restoration after refractive surgery in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis. Sci*. 2012. vol. 53. no. 8. P. 4975-4985. DOI: 10.1167/iovs.12-10170.
7. Riau A.K., Angunawela R.I., Chaurasia S.S., Lee W.S., Tan D.T., Mehta J.S. Reversible femtosecond laser-assisted myopia correction: a non-human primate study of lenticule re-implantation after refractive lenticule extraction. *PLoS One*. 2013. vol. 8. no. 6. e67058. DOI: 10.1371/journal.pone.0067058.
8. Pradhan K.R., Reinstein D.Z., Carp G.I., Archer T.J., Gobbe M., Gurung R. Femtosecond laser-assisted keyhole endokeratophakia: correction of hyperopia by implantation of an allogeneic lenticule obtained by SMILE from a myopic donor. *J Refract Surg*. 2013. vol. 29. no. 11. P. 777-782. DOI: 10.3928/1081597X-20131021-07.

9. Ganesh S., Brar S., Rao P.A. Cryopreservation of extracted corneal lenticles after small incision lenticule extraction for potential use in human subjects. *Cornea*. 2014. vol. 33. no. 12. P. 1355-1362. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000276.
10. Sun L., Yao P., Li M., Shen Y., Zhao J., Zhou X. The Safety and Predictability of Implanting Autologous Lenticule Obtained by SMILE for Hyperopia. *J Refract Surg*. 2015. vol. 31. no. 6. P. 374-379. DOI: 10.3928/1081597X-20150521-03.
11. Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006. vol. 27. no. 19. P. 3675-3683. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
12. Shafiq M.A., Gemeinhart R.A., Yue B.Y., Djalilian A.R. Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma. *Tissue Eng. Part C Methods*. 2012. vol. 18. no. 5. P. 340-348. DOI: 10.1089/ten.tec.2011.0072.
13. Yin H., Qiu P., Wu F., Zhang W., Teng W., Qin Z., Li C., Zhou J., Fang Z., Tang Q., Fu Q., Ma J., Yang Y. Construction of a Corneal Stromal Equivalent with SMILE-Derived Lenticules and Fibrin Glue. *Sci. Rep*. 2016. vol. 6. no. 33848. DOI: 10.1038/srep33848.
14. Yam G.H., Yusoff N.Z., Goh T.W., et al. Decellularization of human stromal refractive lenticles for corneal tissue engineering. *Sci. Rep*. 2016. vol. 6. no. 26339. DOI: 10.1038/srep26339.
15. Huh M.I., Lee K.P., Kim J., Yi S., Park B.U., Kim H.K. Generation of Femtosecond Laser-Cut Decellularized Corneal Lenticule Using Hypotonic Trypsin-EDTA Solution for Corneal Tissue Engineering. *J. Ophthalmol*. 2018. vol. 2018. no. 2590536. DOI:10.1155/2018/2590536.
16. Oh J.Y., Kim M.K., Lee H.J., Ko J.H., Wee W.R., Lee J.H. Processing porcine cornea for biomedical applications. *Tissue Eng. Part C Methods*. 2009. vol. 15. no. 4. P. 635-645. DOI: 10.1089/ten.TEC.2009.0022.