

Сравнительный анализ способов депигментации нативного ретинального пигментного эпителия и 3D культуры его клеток

А.А. Чурилов¹, С.А. Борзенко^{1,2}, Л.В. Кактурский³,
Д.С. Островский¹, Т.З. Керимов^{1,2}, М.Х. Хубецова¹

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Российский университет медицины Минздрава России, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Резюме. Введение. Разработка методов терапии заболеваний ретинального пигментного эпителия, в том числе трансплантации клеток, требует строгого подхода к морфологическому анализу данных. Основополагающим препятствием для иммуногистохимического исследования и микроскопии является наличие меланина, что актуализирует поиск оптимального метода депигментации, сохраняющего структуру клеток. Самым эффективным методом депигментации является протокол № 4. Цель исследования – провести сравнительный анализ методов депигментации нативных препаратов и 3D сфероидов ретинального пигментного эпителия для выявления наиболее эффективного и щадящего алгоритма.

Материалы и методы. Исследовано влияние различных депигментирующих агентов на образцы ретинального пигментного эпителия. Критериями оценки служили степень удаления меланина, сохранность клеточной морфологии, уровень аутофлуоресценции и сроки проведения методик.

Результаты. На основании комплексной оценки определены оптимальные протоколы химической депигментации для последующей конфокальной, световой и фазово-контрастной микроскопии.

Заключение. Разработаны предпочтительные алгоритмы депигментации, обеспечивающие морфофункциональную сохранность ретинального пигментного эпителия и пригодные для детального микроскопического анализа, что формирует основу для стандартизации исследований в данной области.

Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, морфологическое исследование ретинального пигментного эпителия, депигментация ретинального пигментного эпителия, возрастная макулярная дегенерация, морфологическое исследование 3D сфероидов

Для корреспонденции: Алексей Александрович Чурилов. E-mail: churilov_aa@mail.ru

Для цитирования: Чурилов А.А., Борзенко С.А., Кактурский Л.В., Островский Д.С., Керимов Т.З., Хубецова М.Х. Сравнительный анализ способов депигментации нативного ретинального пигментного эпителия и 3D культуры его клеток. Клини. эксп. морфология. 2026;15(3):73–84. DOI: 10.31088/CEM2026.15.3.73-84.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 10.02.2026. Получена после рецензирования 20.02.2026. Принята в печать 14.05.2026.

Comparative analysis of depigmentation methods for retinal pigment epithelium and 3D cell spheroids

A.A. Churilov¹, S.A. Borzenok^{1,2}, L.V. Kakturskiy³,
D.S. Ostrovskiy¹, T.Z. Kerimov^{1,2}, M.Kh. Khubetsova¹

¹ S.N. Fedorov National Medical Research Center “MNTK “Eye Microsurgery”, Moscow, Russia

² Russian University of Medicine, Moscow, Russia

³ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. The development of treatment strategies for retinal pigment epithelium diseases, including cell transplantation approaches, requires a rigorous analysis of morphological data. A major limitation for immunohistochemical studies and microscopy is the presence of melanin, which necessitates the identification of an optimal depigmentation method capable of preserving cellular structure. The study aimed to conduct a comparative analysis of depigmentation methods for native preparations and 3D spheroids in order to identify the most effective and least damaging protocol.

Materials and methods. The effects of various depigmenting agents on retinal pigment epithelium samples were investigated. The evaluation criteria included the degree of melanin removal, preservation of cellular morphology, autofluorescence levels, and the time required for the procedures.

Results. We determined optimal chemical depigmentation protocols for subsequent confocal, light, and phase-contrast microscopy.

Conclusion. We developed preferred depigmentation algorithms that ensure preservation of the morphofunctional properties of retinal pigment epithelium and are suitable for detailed microscopic analysis, thereby providing a basis for the standardization of research in this field.

Keywords: retinal pigment epithelium, morphological study of retinal pigment epithelium, depigmentation of retinal pigment epithelium, age-related macular degeneration, morphological study of 3D spheroids

Corresponding author: Alexey A. Churilov. E-mail: churilov_aa@mail.ru

For citation: Churilov A.A., Borzenok S.A., Kakturskiy L.V., Ostrovskiy D.S., Kerimov T.Z., Khubetsova M.Kh. Comparative analysis of depigmentation methods for retinal pigment epithelium and 3D cell spheroids. Clin. exp. morphology. 2026;15(3)73–84 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.3.73-84.

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Received 10.02.2026. **Received in revised form** 20.02.2026. **Accepted** 14.05.2026.

Введение

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) обладает высокой оптической плотностью за счет наличия меланосом, содержащих меланин, что может значительно затруднять визуализацию структур и процессов внутри клеток с использованием конфокальной микроскопии, флуоресцентной маркировки и иммуногистохимического анализа [1].

В условиях проведения гистологического исследования РПЭ депигментация направлена на нивелирование экранирующего эффекта меланина, «маскирующего» клеточные и субклеточные структуры, определяющие точность диагностики [2].

Указанная проблема актуальна в рамках многих научно-исследовательских направлений – с нативной тканью РПЭ, 3D сфероидом и 2D культурами клеток, где точное определение морфологических и молекулярных характеристик критически значимо.

Сегодня научно-исследовательская среда определяет несколько протоколов депигментации, которые используются как при пигментосодержащих опухолях, так и при исследовании РПЭ, однако их эффективность и применимость к различным типам тканевых образцов (нативная ткань, 3D сфероиды – сферические скопления клеток, самоорганизующиеся в трехмерной структуре, приближенные к естественной среде, 2D культура – плоский слой клеток, воссозданный в лабораторных условиях) остаются недостаточно изученными. Проведение комплексного сравнения их применимости в глобальной перспективе позволит не только оптимизировать процесс исследования и повысить качество визуализации посредством флуоресцентных и иммуногистохимических методов, но и стандартизировать подход к морфологическому анализу РПЭ в разных экспериментальных системах. Каждый из рассмотренных методов обладает индивидуальным набором преимуществ и недостатков. Так, например, M. Zhang et al. подчеркивают значимость перекиси

водорода и ионного излучения в депигментации посредством окислительного стресса [3].

Цель исследования – оценить эффективность протоколов депигментации [4–10] при подготовке нативной ткани РПЭ и 3D сфероидов культуры клеток РПЭ к последующим исследованиям в рамках оптимизации условий визуализации и сравнения морфологических характеристик клеток.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования на тканях, выделенных из трупных человеческих глаз, проводились в соответствии с официально принятыми процедурами и специальным разрешением в рамках законодательства Российской Федерации. Глазной тканевой банк НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова получает трупные человеческие глаза из отделений судебно-медицинских экспертиз трупов Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы на основании лицензии Федеральной государственной службы по надзору за здравоохранением № 99-01-005317 от 30.04.2008 и № ФС-99-01-008251 от 18.02.2013. Лицензия позволяет использовать ткани, выделенные из трупных человеческих глаз, для целей трансплантации и научных исследований.

В исследовании для выделения РПЭ были использованы донорские глазные яблоки человека в количестве шести штук (от трех взрослых доноров). Клетки РПЭ человека выделялись из кадаверного донорского глазного яблока после выкраивания корнеосклерального диска, склера была удалена после меридиональных разрезов и пересечения вортикозных вен и зрительного нерва. Хориокапиллярная пластинка (ХКП) отделялась от сетчатки, фиксировалась с помощью двух пластиковых колец размером 14 и 15 мм по методике, разработанной С.А. Борзенком и А.А. Чуриловым с соавторами (патент № RU2836977C1, Способ получения образца

фрагмента ретиального пигментного эпителия сетчатки). Далее нативную ткань, фиксированную кольцами, помещали в фиксирующий 10% раствор формалина на час при комнатной температуре, затем проводили депигментацию.

Для создания 3D сфероидов ХКП помещали в чашку Петри, заливали 2 мл раствором коллагеназы I типа (Thermo Scientific, Германия) и инкубировали 10 минут при температуре 37°C, 5% CO₂. После нейтрализации фетальной бычьей сывороткой (fetal bovine serum, FBS) («ПанЭко», Россия) клетки РПЭ были механически отделены от мембраны Бруха струйным промыванием. Далее суспензия клеток помещалась в 15 мл пробирку и центрифугировалась (1800 оборотов) 5 минут. Затем жидкость из пробирок была убрана до клеток, добавлены 3 мл среды следующего состава: DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США) (1:1), 1% Gibco GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, Германия), 1% антибиотиков («ПанЭко», Россия) и 10% фетальной бычьей сыворотки FBS («ПанЭко», Россия). Далее были проведены ресуспендирование, перенос в 25 см³ флакон для культивирования и установка в инкубатор (37°C, 5% CO₂) на 7 суток.

По достижении 80% конфлюэнтности среду удаляли и добавляли в каждый флакон 3 мл раствора Версена («ПанЭко», Россия) на 1 минуту, затем 3 мл 0,25% раствора трипсин-ЭДТА («ПанЭко», Россия) и устанавли-

вали в инкубатор (37°C, 5% CO₂) на 5 минут. Далее добавляли 1 мл питательной среды, смесь перемешивали и собирали в пробирку 15 мл и вносили еще 2 мл среды, после чего проводили центрифугирование (1800 оборотов, 5 минут) (SL-40 R, Thermo Scientific, Германия).

Далее надосадочную жидкость удаляли, добавляли 1 мл среды, смесь перемешивали с последующим забором 10 мкл полученной жидкости и подсчетом клеток в автоматическом счетчике клеток LUNA-II (Logos Biosystems, Южная Корея). Клеточная суспензия в концентрации 81 000 кл/190 мкл вносилась в неадгезивные 81-луночные планшеты 3D Petri Dishes (MicroTissues/Sigma-Aldrich, США). Полученные сфероиды трехкратно отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе (phosphate-buffered saline, PBS), после чего проводили фиксацию в 10% растворе формалина в течение 10 минут, затем трижды отмывали в PBS. После получения сфероидов проводилась депигментация.

В рамках данного исследования были определены следующие протоколы депигментации (табл. 1–7).

Эффективность депигментации нативного пигментного эпителия и 3D культуры РПЭ была исследована на световом микроскопе Biolar (PZO Warszawa, Польша), световом фазово-контрастном микроскопе IX81с интегрированной цифровой фотокамерой XC10 (Olympus, Япония) и лазерном сканирующем конфокальном

Таблица 1 | Table 1

Условия проведения протокола № 1 | Conditions for conducting Protocol No. 1

№ No.	Манипуляция Procedure	Температура Temperature	Время Time
1	20% раствор сахарозы 20% sucrose solution	Комнатная Room	2 часа 2 hours
2	30% раствор сахарозы 30% sucrose solution	4°C	24 часа 24 hours
3	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)	Комнатная Room	2 минуты 2 minutes
4	Раствор перманганата калия 0,25% 0.25% KMnO ₄ solution		30 минут 30 minutes
5	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)		2 минуты 2 minutes
6	1% раствор щавелевой кислоты 1% oxalic acid solution		2 минуты 2 minutes
7	Отмывание в MQ воде Rinsing in MQ water		5 минут 5 minutes

Таблица 2 | Table 2

Условия проведения протокола № 2 | Conditions for conducting Protocol No. 2

№ No.	Манипуляция Procedure	Температура Temperature	Время Time
1	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)	Комнатная Room	2 минуты 2 minutes
2	10% раствор перекиси водорода 10% hydrogen peroxide solution	65°C	2 часа 2 hours
3	Отмывание в MQ воде Rinsing in MQ water	Комнатная Room	5 минут 5 minutes

Таблица 3 | Table 3

Условия проведения протокола № 3 | Conditions for conducting Protocol No. 3

№ No.	Манипуляция Procedure	Температура Temperature	Время Time
1	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)	Комнатная Room	2 минуты 2 minutes
2	Раствор 1% перманганата калия 1% KMnO ₄ solution		5 минут 5 minutes
3	2% раствор щавелевой кислоты 2% oxalic acid solution		2 минуты 2 minutes
4	Отмывание в MQ воде Rinsing in MQ water		5 минут 5 minutes

Таблица 4 | Table 4

Условия проведения протокола № 4 | Conditions for conducting Protocol No. 4

№ No.	Манипуляция Procedure	Температура Temperature	Время Time
1	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)	Комнатная Room	2 минуты 2 minutes
2	0,25% раствор перманганата калия 0.25% KMnO ₄ solution		40 минут 40 minutes
3	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)		2 минуты 2 minutes
4	1% раствор щавелевой кислоты 1% oxalic acid solution		5 минут 5 minutes
5	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)		2 минуты 2 minutes
6	0,25% раствор перманганата калия 0.25% KMnO ₄ solution		10 минут 10 minutes
7	1% раствор щавелевой кислоты 1% oxalic acid solution		5 минут 5 minutes
8	Отмывание в MQ воде Rinsing in MQ water		5 минут 5 minutes

Таблица 5 | Table 5

Условия проведения протокола № 5 | Conditions for conducting Protocol No. 5

№ No.	Манипуляция Procedure	Температура Temperature	Время Time
1	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)	Комнатная Room	2 минуты 2 minutes
2	0,25% раствор перманганата калия 0.25% KMnO ₄ solution		30 минут 30 minutes
3	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)		2 минуты 2 minutes
4	1% раствор щавелевой кислоты 1% oxalic acid solution		10 минут 10 minutes
5	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)		2 минуты 2 minutes
6	0,3% раствор перекиси водорода в 95% этаноле 0.3% hydrogen peroxide solution in 95% ethanol		30 минут 30 minutes
7	Отмывание в MQ воде Rinsing in MQ water		5 минут 5 minutes

Таблица 6 | Table 6

Условия проведения протокола № 6 | Conditions for conducting Protocol No. 6

№ No.	Манипуляция Procedure	Температура Temperature	Время Time
1	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)	Комнатная Room	2 минуты 2 minutes
2	0,25% раствор дихромата калия 0.25% potassium dichromate solution	65°C	30 минут 30 minutes
3	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)	Комнатная Room	2 минуты 2 minutes
4	75% раствор этанола 75% ethanol solution		10 минут 10 minutes
5	Отмывание в MQ воде Rinsing in MQ water		5 минут 5 minutes

Таблица 7 | Table 7

Условия проведения протокола № 7 | Conditions for conducting Protocol No. 7

№ No.	Манипуляция Procedure	Температура Temperature	Время Time
1	Отмывание в растворе PBS (на MQ воде) Rinsing in PBS solution (in MQ water)	Комнатная Room	2 минуты 2 minutes
2	37% раствор перекиси водорода 37% hydrogen peroxide solution		12 часов 12 hours
3	Отмывание в MQ воде Rinsing in MQ water		5 минут 5 minutes

микроскопе FluoView FV10i (Olympus, Япония). В качестве контроля использовались нативная ткань и 3D сфероиды, не подвергавшиеся депигментации.

Результаты

Полученные визуальные данные позволили судить о следующих характеристиках протоколов при исследовании посредством нативной световой микроскопии (табл. 8).

В рамках световой микроскопии нативной ткани наиболее оптимальным методом депигментации РПЭ представляется протокол № 2 – в условиях сохранности клеточной структуры РПЭ достигаются глубокие

значения депигментации при малой длительности осуществления. Конкурентоспособным может также являться протокол № 4, однако протокол № 2 имеет преимущество в условиях большей сохранности структуры.

Полученные результаты представлены наглядно, в рамках сравнения протоколов № 2, № 4 и № 5, в частности с точки зрения сохранности структуры препарата и степени депигментации (рис. 1).

Изготовленные препараты сфероидов РПЭ также были проанализированы в контексте исследования эффективности методов депигментации при проведении фазово-контрастной микроскопии (табл. 9).

Таблица 8 | Table 8

Характеристики протоколов для нативной световой микроскопии | Characteristics of protocols for light microscopy of native samples

№ No.	Сохранность структуры Structural preservation	Глубина депигментации Degree of depigmentation	Время Time
1	Средняя Moderate	Высокая High	1,5 часа 1.5 hours
2	Очень высокая Very high	Высокая High	2 часа 2 hours
3	Очень высокая Very high	Низкая Low	15 минут 15 minutes
4	Высокая High	Высокая High	1,5 часа 1.5 hours
5	Высокая High	Очень низкая Very low	2 часа 2 hours
6	Очень низкая Very low	Очень низкая Very low	40 минут 40 minutes
7	Очень низкая Very low	Высокая High	12 часов 12 hours

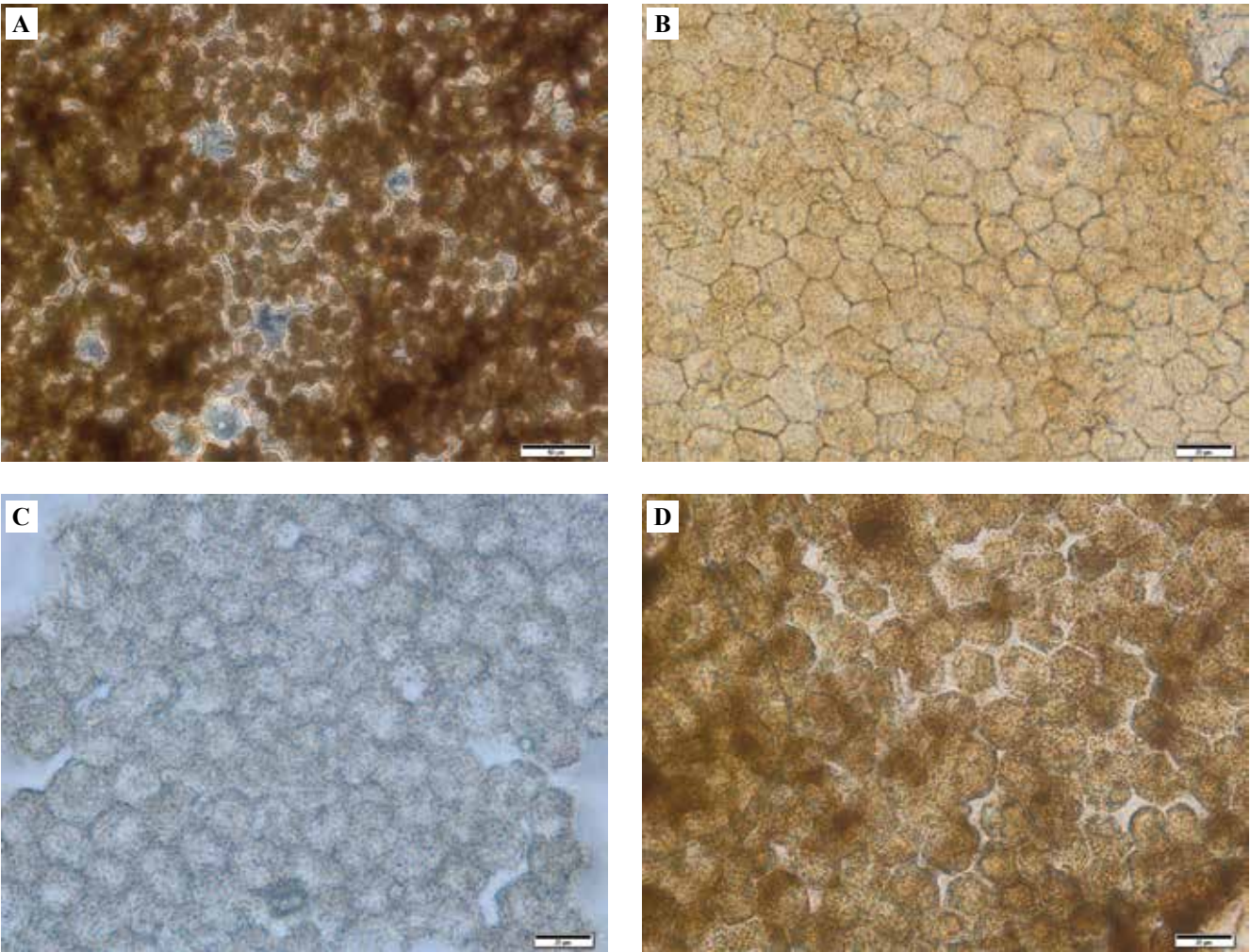


Рис. 1. Сравнение протоколов депигментации нативного РПЭ.
А – контроль, В – протокол № 2: очень высокая сохранность структур РПЭ при высокой глубине депигментации, С – протокол № 4: высокая глубина депигментации и высокая сохранность структур, D – протокол № 5: высокая сохранность структур при очень низкой глубине депигментации. Световая микроскопия, ×400

Fig. 1. Comparison of depigmentation protocols for native retinal pigment epithelium.
A – control, B – protocol No. 2: a very high preservation of retinal pigment epithelium structures is observed with a high degree of depigmentation, C – protocol No. 4: high depigmentation depth and high structural preservation, D – protocol No. 5: high structural preservation with a very low degree of depigmentation. Light microscopy, ×400

Таблица 9 | Table 9

Характеристики протоколов для фазово-контрастной микроскопии сфероидов ретинального пигментного эпителия |
Characteristics of protocols for phase-contrast microscopy of retinal pigment epithelial spheroids

№ No.	Глубина депигментации Degree of depigmentation	Сохранность структуры Structural preservation	Равномерность депигментации Uniformity of depigmentation	Время Time
1	Средняя Moderate	Низкая Low	Высокая High	1,5 часа 1.5 hours
2	Высокая High	Очень высокая Very high	Высокая High	2 часа 2 hours
3	Низкая Low	Высокая High	Низкая Low	15 минут 15 minutes
4	Средняя Moderate	Высокая High	–	1,5 часа 1.5 hours
5	Низкая Low	Низкая Low	Низкая Low	2 часа 2 hours
6	Очень низкая Very low	Низкая Low	–	40 минут 40 minutes
7	Высокая High	Высокая High	Низкая Low	12 часов 12 hours

В данном контексте оптимальным также представляется выбор депигментации по протоколу № 2, так как именно он характеризуется наиболее высокими показателями глубины депигментации в условиях сохранности структуры клеток РПЭ и равномерности распределения действия при сравнительно быстром осуществлении. Для протоколов № 4 и № 6 оценка равномерности депигментации не проводилась ввиду гетерогенности полученного результата, не позволяющей отнести его к какой-либо категории.

Полученные результаты для протоколов № 2, № 4 и № 5 в контексте фазово-контрастной микроскопии представлены визуально (рис. 2).

На изображениях ретинального пигментного эпителия в рамках конфокальной микроскопии определяется ряд качественных различий (табл. 10).

Описанные протоколы могут быть рассмотрены с точки зрения различных характеристик. Так, на основании полученных данных наиболее эффективным методом депигментации может считаться протокол № 4, однако наиболее сохранной структурой отличаются препараты для протоколов № 2 и № 7. Наиболее значительна аутофлуоресценция для протоколов № 5 и № 7, однако ее интенсивность все-таки не обладает высокой выраженностью по сравнению с контролем, также следует отметить, что при протоколе № 5 разрушаются клетки.

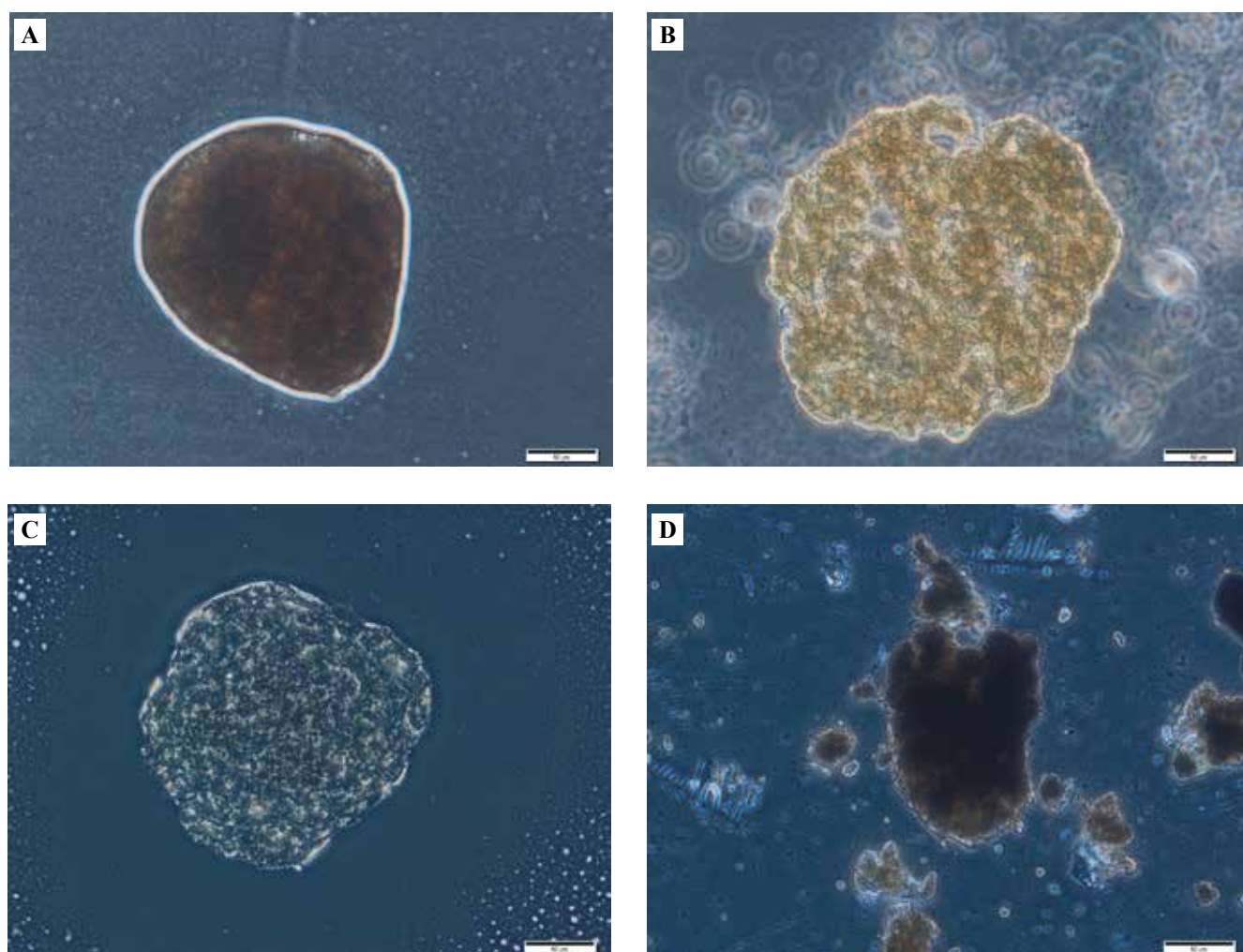


Рис. 2. Сравнение протоколов депигментации 3D сфероидов.

А – контроль, В – протокол № 2: очень высокая сохранность структур РПЭ при высокой глубине депигментации и ее высокой равномерности, С – протокол № 4: средняя глубина депигментации и высокая сохранность структур, D – протокол № 5: низкая сохранность структур при низкой глубине депигментации и ее значительной неравномерности. Фазово-контрастная микроскопия, $\times 200$

Fig. 2. Comparison of depigmentation protocols for 3D spheroids.

A – control, B – protocol No. 2: a very high preservation of retinal pigment epithelium structures is observed with a high degree of depigmentation, C – protocol No. 4: high depigmentation depth and high structural preservation, D – protocol No. 5: high structural preservation with a very low degree of depigmentation. Phase-contrast microscopy, $\times 200$

Таблица 10 | Table 10

Характеристики протоколов для конфокальной микроскопии | Characteristics of protocols for confocal microscopy

№ No.	Агрессивность Aggressiveness	Глубина депигментации Degree of depigmentation	Сохранность структуры Structural preservation	Аутофлуоресценция Autofluorescence	Время Time
1	Высокая High	Высокая High	Средняя Moderate	Средняя Moderate	1,5 часа 1.5 hours
2	Низкая Low	Средняя Moderate	Высокая High	Средняя Moderate	2 часа 2 hours
3	Низкая Low	Средняя Moderate	Очень высокая Very low	Низкая Low	15 минут 15 minutes
4	Средняя Moderate	Высокая High	Высокая High	Средняя Moderate	1,5 часа 1.5 hours
5	Высокая High	Очень высокая Very high	Низкая Low	Низкая Low	2 часа 2 hours
6	Очень высокая Very high	Высокая High	Низкая Low	Средняя Moderate	40 минут 40 minutes
7	Очень низкая Very low	Средняя Moderate	Очень высокая Very low	Очень низкая Very low	12 часов 12 hours

Полученные результаты представлены наглядно, в рамках сравнения протоколов № 2, № 4 и № 5, в частности с точки зрения сохранности структуры препарата (рис. 3).

В рамках проведения конфокальной микроскопии сфероидов также была получена комплексная оценка эффективности протоколов (табл. 11).

На данном этапе наибольшую эффективность продемонстрировали протоколы № 2 и № 4 – в условиях

сравнительно высокого уровня депигментации указанные протоколы позволяют сохранить клеточную структуру сфероида, но оставляют умеренную аутофлуоресценцию (рис. 4).

Таким образом, процесс депигментации ретинального пигментного эпителия, в том числе в условиях культуры 3D сфероида, требует расширенного анализа доступных ресурсов и получаемых результатов. В условиях чрезмерной агрессивности используемого ме-

Таблица 11 | Table 11

Характеристики протоколов для конфокальной микроскопии сфероидов ретинального пигментного эпителия | Characteristics of protocols for confocal microscopy of retinal pigment epithelial spheroids

№ No.	Глубина депигментации Degree of depigmentation	Сохранность структуры Structural preservation	Аутофлуоресценция Autofluorescence	Время Time
1	Средняя Moderate	Низкая Low	Очень высокая Very high	1,5 часа 1.5 hours
2	Высокая High	Высокая High	Средняя Moderate	2 часа 2 hours
3	Низкая Low	Низкая Low	Очень низкая Very low	15 минут 15 minutes
4	Высокая High	Высокая High	Средняя Moderate	1,5 часа 1.5 hours
5	Низкая Low	Низкая Low	Средняя Moderate	2 часа 2 hours
6	Низкая Low	Средняя Moderate	Низкая Low	40 минут 40 minutes
7	Очень низкая Very low	Очень низкая Very low	Очень низкая Very low	12 часов 12 hours

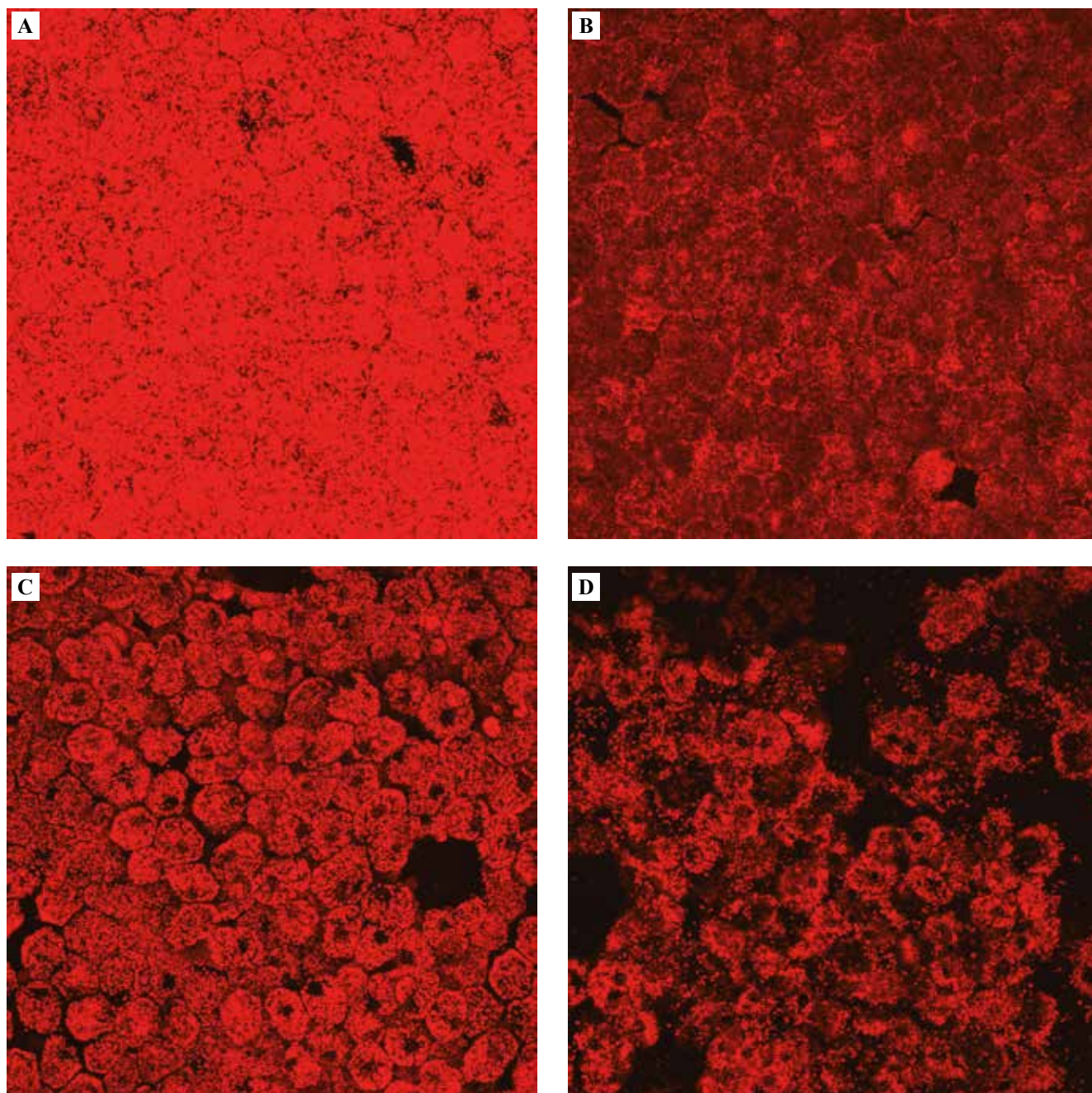


Рис. 3. Сравнение протоколов депигментации РПЭ для конфокальной микроскопии, $\times 600$.

А – контроль, В – протокол № 2: высокая сохранность структур РПЭ при средней глубине депигментации, низкой агрессивности и средней интенсивности аутофлуоресценции, С – протокол № 4: высокая сохранность структур РПЭ при высокой глубине депигментации, средней агрессивности и средней интенсивности аутофлуоресценции, D – протокол № 5: низкая сохранность структур РПЭ при очень высокой глубине депигментации, высокой агрессивности и низкой интенсивности аутофлуоресценции

Fig. 3. Comparison of depigmentation protocols for retinal pigment epithelium in confocal microscopy, $\times 600$.

A – control, B – protocol No. 2: high preservation of retinal pigment epithelium structures with a moderate degree of depigmentation, low aggressiveness, and moderate autofluorescence intensity, C – protocol No. 4: high preservation of retinal pigment epithelium structures with a high degree of depigmentation, moderate aggressiveness, and moderate autofluorescence intensity, D – protocol No. 5: low preservation of retinal pigment epithelium structures with a very high degree of depigmentation, high aggressiveness, and low autofluorescence intensity

тогда депигментации, например протокола № 5, в ряде случаев наблюдается нарушение клеточной структуры.

Также в связи с негативным влиянием высоких значений аутофлуоресценции на полученные результаты

исследования предпочтительными методами могут считаться протоколы № 2 и № 4.

Полученные данные представлены наглядно (табл. 12).

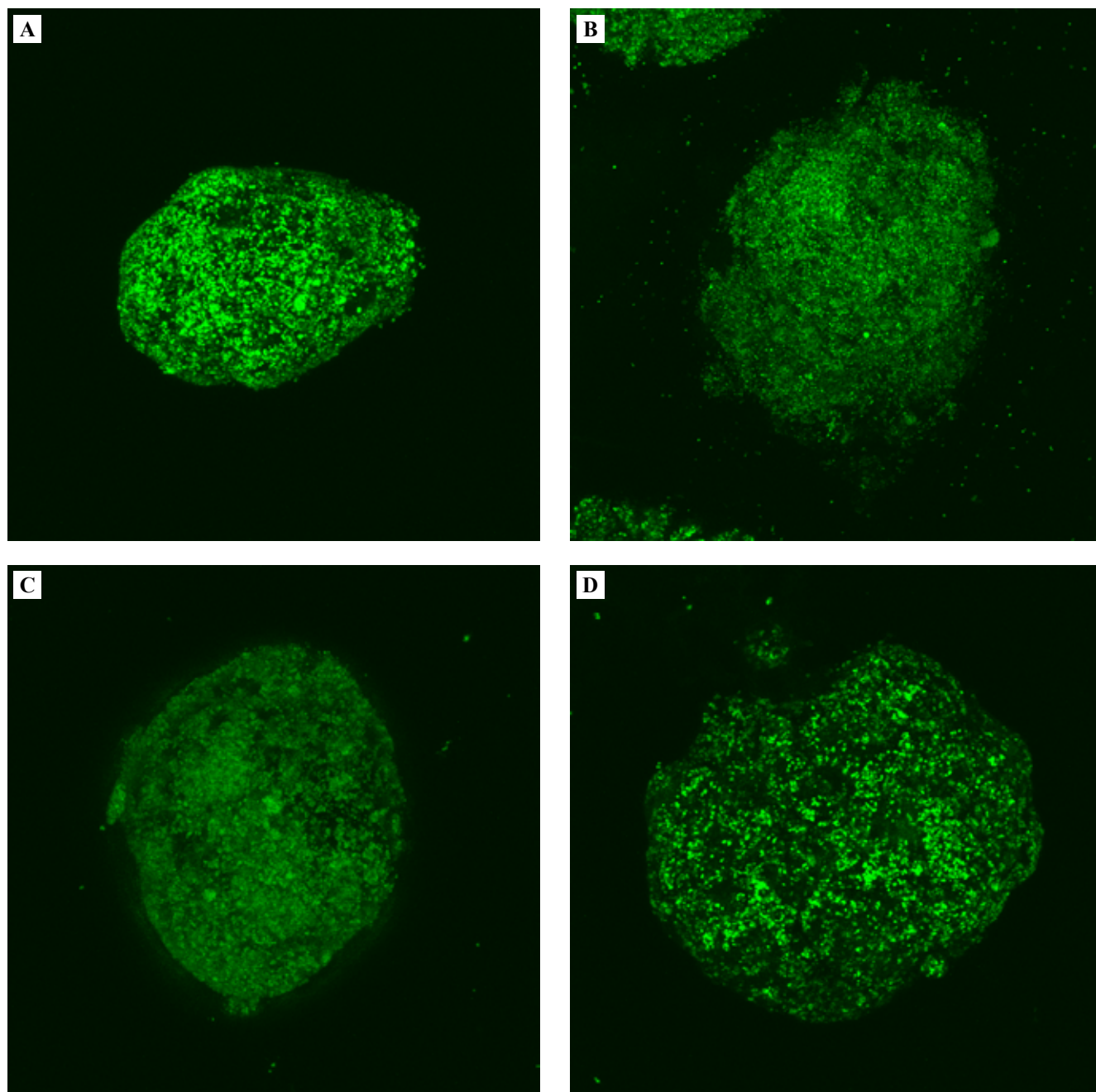


Рис. 4. Сравнение протоколов депигментации 3D сфероидов для конфокальной микроскопии, $\times 600$.

А – контроль, В – протокол № 2: представлена высокая сохранность структур РПЭ при высокой глубине депигментации и средней интенсивности аутофлуоресценции, С – протокол № 4: высокая сохранность структур РПЭ при высокой глубине депигментации и средней интенсивности аутофлуоресценции, Д – протокол № 5: низкая сохранность структур РПЭ при низкой глубине депигментации и средней интенсивности аутофлуоресценции

Fig. 4. Comparison of depigmentation protocols for 3D spheroids in confocal microscopy, $\times 600$.

А – control, В – protocol No. 2: high preservation of retinal pigment epithelium structures with a high degree of depigmentation and moderate autofluorescence intensity, С – protocol No. 4: high preservation of retinal pigment epithelium structures with a high degree of depigmentation and moderate autofluorescence intensity, Д – protocol No. 5: low preservation of retinal pigment epithelium structures with a low degree of depigmentation and moderate autofluorescence intensity

Таблица 12 | Table 12

Оптимальный протокол | The optimal protocol

Тип микроскопии Microscopy type	Оптимальный протокол Optimal protocol	Преимущества Advantages	Недостатки Limitations
Конфокальная (РПЭ) Confocal (retinal pigment epithelium)	№ 2, № 4 No. 2 and 4	Глубокая депигментация + сохранность структуры Deep depigmentation + structural preservation	Длительное время (1,5–2 часа) Long processing time (1.5–2 hours)
Нативная (РПЭ) Native (retinal pigment epithelium)	№ 2, № 4 No. 2 and 4	Высокая депигментация, минимальные повреждения High depigmentation, minimal damage	
Световая (сфероиды) Light microscopy (spheroids)	№ 2 No. 2	Равномерная депигментация, сохранность структуры Uniform depigmentation, preservation of cellular structure	–
Конфокальная (сфероиды) Confocal microscopy (spheroids)	№ 2, № 4 No. 2 and 4	Умеренная аутофлуоресценция, хорошая сохранность Moderate autofluorescence, good structural preservation	–

Заключение

В рамках конфокальной микроскопии ретинального пигментного эпителия предпочтительными являются протоколы № 2 и № 4. В свою очередь, при исследовании сфероидов оптимально применение протоколов № 2 (для световой и фазово-контрастной микроскопии) и № 4 (для конфокальной микроскопии) при особом преимуществе со стороны последнего ввиду наиболее высокой сохранности структуры. Вместе с тем необходимо отметить, что с точки зрения 3D клеточных сфероидов ретинального пигментного эпителия отмеченные протоколы были наилучшими, однако сохраняли аутофлуоресценцию, что говорит о необходимости дальнейшего изучения этого направления.

Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым выбор метода депигментации должен зависеть от типа биологического материала и целей микроскопического анализа, а также от необходимости сохранения первоначальной структуры изучаемого материала.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.А. Чурилов, С.А. Борзенко, Л.В. Кактурский, Д.С. Островский, Т.З. Керимов, М.Х. Хубецова.
Сбор и обработка материала – А.А. Чурилов, С.А. Борзенко, Л.В. Кактурский, Д.С. Островский, Т.З. Керимов.
Анализ данных – А.А. Чурилов, М.Х. Хубецова.
Написание текста – А.А. Чурилов, М.Х. Хубецова, Т.З. Керимов.
Редактирование – С.А. Борзенко, Л.В. Кактурский.

Author contribution

Conceived the study and designed the experiment – A.A. Churilov, S.A. Borzenok, L.V. Kakturskiy, D.S. Ostrovskiy, T.Z. Kerimov, M.Kh. Khubetsova.
Data collection – A.A. Churilov, S. A. Borzenok, L.V. Kakturskiy, D.S. Ostrovskiy, T.Z. Kerimov.
Data analysis – A.A. Churilov, M.Kh. Khubetsova.
Wrote the paper – A.A. Churilov, M.Kh. Khubetsova, T.Z. Kerimov.
Edited the manuscript – S.A. Borzenok, L.V. Kakturskiy.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Зак П.П., Бухтияров И.В., Прокофьев А.Б., Ларичев А.В., Большакова В.А., Измеров Н.Ф. и др.* Разработка рефлектометрического измерительного комплекса для оценки оптической плотности макулярных пигментов и концентрации фототоксических соединений в сетчатке глаза. Медицина труда и промышленная экология. 2009;7:31–36. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=12689291> (получено 09.02.2026).
Zak PP, Boukhtiarov IV, Prokofiev AB, Larichev AV, Bolshakova VA, Izmerov NF et al. Specification of reflectometric measurement complex to evaluate optic density of macular pigments and concentration of phototoxic chemicals in retina. *Meditcina truda i promyshlennaya ekologiya = Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology.* 2009;7:31–36 (In Russ.). Available from <https://elibrary.ru/item.asp?id=12689291> (accessed 09.02.2026).

2. *Milman T, Grossniklaus HE, Goldman-Levy G, Kivelä TT, Coupland SE, White VA et al.* The 5th edition of the World Health Organization classification of tumours of the eye and orbit. *Ocul Oncol Pathol.* 2023;9(3-4):71–95. DOI: 10.1159/000530730.

3. *Zhang M, Zhang R, Zhao X, Ma Z, Xin J, Xu S et al.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of ocular diseases: an overview. *Mol Biol Rep.* 2024;51(1):454. DOI: 10.1007/s11033-024-09425-5.

4. *Iwai-Takekoshi L, Ramos A, Schaler A, Weinreb S, Blazeski R, Mason C.* Retinal pigment epithelial integrity is compromised in the developing albino mouse retina. *J Comp Neurol.* 2016;524(18):3696–716. DOI: 10.1002/cne.24025.

5. *Manicam C, Pitz S, Brochhausen C, Grus FH, Pfeiffer N, Gericke A.* Effective melanin depigmentation of human and murine ocular tissues: an improved method for paraffin and frozen sections. *PLoS One.* 2014;9(7):e102512. DOI: 10.1371/journal.pone.0102512.

6. Nazir S, Charlesworth RPG, Walkden-Brown SW, Gerber PF. A melanin bleaching method to prevent non-specific immunostaining of chicken feathers. *MethodsX*. 2020;7:100957. DOI: 10.1016/j.mex.2020.100957.
7. Orchard GE, Calonje E. The effect of melanin bleaching on immunohistochemical staining in heavily pigmented melanocytic neoplasms. *Am J Dermatopathol*. 1998;20(4):357–61. DOI: 10.1097/00000372-199808000-00006.
8. Blenkinsop TA, Salero E, Stern JH, Temple S. The culture and maintenance of functional retinal pigment epithelial monolayers from adult human eye. *Methods Mol Biol*. 2013;945:45–65. DOI: 10.1007/978-1-62703-125-7_4.
9. Shen H, Wu W. Study of melanin bleaching after immunohistochemistry of melanin-containing tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(4):303–7. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000075.
10. Hu L, Gao Y, Ren C, Chen Y, Cai S, Xie B et al. Retaining antigenicity and DNA in the melanin bleaching of melanin-containing tissues. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020;13(8):2027–34. PMID: 32922597.

Информация об авторах

Алексей Александрович Чурилов – младший научный сотрудник лаборатории трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова.

Сергей Анатольевич Борзенко – доктор медицинских наук, профессор, заведующий Центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, профессор кафедры офтальмологии Российского университета медицины.

Лев Владимирович Кактурский – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Дмитрий Сергеевич Островский – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова.

Тимур Захирович Керимов – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, ассистент кафедры офтальмологии Российского университета медицины.

Мадина Хетагровна Хубецова – кандидат медицинских наук, заведующая глазным тканевым банком НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова.

Author information

Alexey A. Churilov – Junior Researcher, Laboratory of Transplantology and Cell Biology, Center for Fundamental and Applied Medical and Biological Problems, S.N. Fedorov National Medical Research Center “MNTK “Eye Microsurgery”.
<https://orcid.org/0000-0003-1018-8257>

Sergey A. Borzenok – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Center for Fundamental and Applied Medical and Biological Problems, S.N. Fedorov National Medical Research Center “MNTK “Eye Microsurgery”; Professor, Ophthalmology Department, Russian University of Medicine.
<https://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

Lev V. Kakturskiy – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-7896-2080>

Dmitriy S. Ostrovskiy – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Transplantology and Cell Biology, Center for Fundamental and Applied Medical and Biological Problems, S.N. Fedorov National Medical Research Center “MNTK “Eye Microsurgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>

Timur Z. Kerimov – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Transplantology and Cell Biology, Center for Fundamental and Applied Medical and Biological Problems, S.N. Fedorov National Medical Research Center “MNTK “Eye Microsurgery”; Teaching Assistant, Ophthalmology Department, Russian University of Medicine.
<https://orcid.org/0000-0001-8967-6370>

Madina Kh. Khubetsova – Cand. Sci. (Med.), Head of the Eye Tissue Bank, S.N. Fedorov National Medical Research Center “MNTK “Eye Microsurgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-6378-8750>

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).