

# Технологии создания, оценка биосовместимости и безопасности коллагенового матрикса в составе биоинженерной клеточной конструкции

Н.С. Егорова<sup>1</sup>, Е.В. Ченцова<sup>1</sup>, С.В. Флора<sup>1</sup>, Н.В. Боровкова<sup>2</sup>, О.И. Конюшко<sup>3</sup>, М.С. Макаров<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России

<sup>2</sup> ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы

<sup>3</sup> ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Москва

*Тяжелые заболевания передней поверхности глаза, такие как язвы и эрозии роговицы различного генеза, последствия ожогов роговицы и конъюнктивы, являются актуальной проблемой офтальмологии. Цель работы — оценить пригодность известных коллагеновых субстратов на основе коллагена I и II типа для создания биоинженерной подложки-носителя для клеток буккального эпителия кролика. Материал и методы. Исследование проводилось на 12 кроликах (24 глаза), на интактную роговицу которых помещали контактную линзу, покрытую исследуемым видом коллагена I типа, полученного из сухожилия кролика методом кислотной экстракции. В качестве контроля на роговицу парного глаза накладывали контактную линзу, покрытую коллагеновым гелем для заживления роговицы глаза на основе коллагена II типа. Оценивали биосовместимость клеток буккального эпителия, коллагенов I и II типа и переносимость коллагеновых матриксов. Результаты. Коллаген I типа, полученный из сухожилий кроликов, токсического действия на клетки буккального эпителия не оказывал. Установлено, что использованные виды коллагена являются оптимальной средой для клеток буккального эпителия, клетки хорошо адгезируют и могут быть донесены до места повреждения роговицы. Коллаген I типа, полученный методом кислотной экстракции, оказывал раздражающее действие на роговицу кроликов, что связано с высоким содержанием уксусной кислоты. Проведена модификация методики получения коллагена I типа с дополнительным снижением кислотности. Заключение. Полученный таким образом коллаген I типа и коллагеновый гель для заживления роговицы на основе коллагена II типа показали свою безопасность и эффективность при использовании их в биоинженерной конструкции.*

**Ключевые слова:** повреждение роговицы, экспериментальное исследование, буккальный эпителий, коллаген, биоинженерная конструкция, Аппликолл, кератопротектор.

Российский офтальмологический журнал, 2017; 2: 71-77

В современном мире ввиду постоянно возрастающей частоты травматизации органа зрения, в частности переднего отрезка глаза, актуальным вопросом остается поиск новых методов лечения повреждений роговицы. В рамках программы ВОЗ «Vision 2020 — The right to sight» представлены данные, согласно которым в течение года в мире отмечается около 55 млн случаев травм глаза. У 1,6 млн пострадавших в исходе травмы развилась полная слепота, а у 19 млн человек наблюдалось снижение зрения [1]. Исследование причин инвалидности вследствие патологии

органа зрения подтвердило, что ведущее место в нозологической структуре инвалидности принадлежит травмам глаза.

Тяжелые заболевания передней поверхности глаза, такие как язвы и эрозии роговицы различного генеза, последствия ожогов роговицы и конъюнктивы сопровождаются недостаточностью функции стволовых лимбальных эпителиальных клеток. Это приводит к выраженным патологическим изменениям ткани роговицы: снижению рецепторной вооруженности клеточных мем-

бран, нарушению основных ферментативных взаимодействий, снижению продукции цитокинов и пр. Кроме того, при длительном отсутствии эпителиального покрова в роговице происходит нарушение метаболических процессов: с одной стороны, снижается синтез белка и гликозаминогликанов, с другой — увеличивается активность протеолитических ферментов, что в сумме приводит к развитию хронического воспаления с прогрессирующими явлениями аутосенсibilизации и аутоинтоксикации, замедлению регенерации. Все эти процессы приводят к анатомическим и функциональным нарушениям, таким как потеря прозрачности, персистирующие эрозии и язвы, васкуляризация роговицы, и, как следствие, к значительному снижению остроты зрения и слепоте [2–5].

К настоящему времени накоплен значительный опыт и предложен широкий спектр эффективных, патогенетически ориентированных методов консервативного, хирургического и комплексного лечения повреждений роговицы. Тем не менее основным методом на сегодняшний день остается хирургическое вмешательство на роговой оболочке: послойная или сквозная кератопластика, аутоотенонопластика, покрытие аутоконъюнктивой, пластика амниотической оболочкой и т. д. Однако после хирургического вмешательства сохраняется высокая частота рецидивов, возможно отторжение и некроз трансплантата, развитие иммунологического конфликта. Частота развития болезни трансплантата с исходом в помутнение после кератопластики, по данным разных авторов, составляет 5–79 %. Кроме того, на сегодняшний день наблюдается острый дефицит донорских роговиц на фоне возрастающего количества пациентов, ожидающих очереди на кератопластику, что создает объективные трудности при выборе этой операции в качестве основной стратегии лечения.

Экспериментальные и клинические исследования последних лет показали эффективность трансплантации стволовых и прогениторных клеток, как аллогенных, так и аутологичных, оказывающих выраженное влияние на процессы регенерации и репарации тканей глаза. Имеются данные о положительных результатах экспериментальных исследований по трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при ожогах роговицы [6, 7]. Для коррекции лимбально-клеточной недостаточности на практике с успехом используются стволовые клетки лимба, как аутолимбальные (с парного глаза), так и аллолимбальные (с глаз живых или кадаверных доноров) [8–12]. Однако существующие методы лечения роговицы путем трансплантации клеток не всегда оказываются эффективными и, к сожалению, зачастую не приводят к ожидаемому результату [13]. Таким образом, решение данной проблемы зависит от поиска новых доступных ресурсов клеточной терапии, применение которых по-

зволит восстановить нормальное течение репаративных процессов в поврежденной роговице и добиться удовлетворительных функциональных результатов.

С развитием новых технологий в молекулярной и клеточной биологии активно развивается новое направление — трансплантация аутологичных (собственных) клеток пациента, выделенных из разных тканей органов. Доказана эффективность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека, нейрональных стволовых клеток, эпителия конъюнктивы в качестве аутологичного материала для клеточной терапии и тканевой инженерии [14]. Однако процедура их получения является весьма трудоемкой и далеко не всегда доступной в клинической практике.

На сегодняшний день имеются единичные данные о возможности эффективного использования для клеточной терапии прогениторных клеток, выделенных из буккального эпителия слизистой щеки [15–17]. Показано, что клетки-предшественники буккального эпителия кролика обладают высокой пролиферативной активностью, биологически полноценны в течение длительных сроков культивирования и способны к адгезии на коллагеновых подложках разных типов [18]. При трансплантации на поврежденную поверхность такие клетки выделяют биологически активные вещества и ферменты, стимулирующие процессы репарации в ткани [14, 19]. Таким образом, есть основания считать, что выделенные из буккального эпителия прогениторные клетки могут использоваться для создания биоинженерных конструкций, в том числе предназначенных для лечения заболеваний переднего отрезка глаза, которые трудно поддаются традиционным методам терапии. Для создания такой конструкции необходима комбинация с биополимерным матриксом, который будет служить средой для сохранения жизнеспособности клеток, а также обеспечивать надежную фиксацию биологического материала для транспортировки на пораженную поверхность.

Наиболее перспективным материалом для использования в качестве матрикса является коллаген, так как он обладает низкой иммуногенностью и стимулирует процессы регенерации тканей [20–22]. Коллаген представляет собой основной фибриллярный белок межклеточного матрикса соединительной ткани, во многом определяя ее трехмерную топографию и механические функции. На сегодняшний день известно более 20 типов коллагена, в биотехнологии наиболее часто используют коллаген I и II типа, при этом процедура выделения коллагена и изготовления из него биотрансплантатов может сильно варьировать.

**ЦЕЛЮ** работы стала оценка пригодности известных коллагеновых субстратов на основе коллагена I и II типа для создания биоинженерной подложки-носителя для клеток буккального эпителия кролика.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для эксперимента использованы лабораторные животные — кролики породы шиншилла весом 2,0–2,5 кг. При проведении эксперимента руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, № 123 от 18.03.1986 и Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1975 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

**Получение коллагеновых матриц.** Для получения коллагена I типа сухожилия очищали от жировой и мышечной ткани, промывали физиологическим раствором, измельчали ножницами. Затем в стерильную колбу с измельченными сухожилиями добавляли раствор буфера (1 М NaCl, 0,05 М Tris-HCl, pH 7,5) и помещали ее на магнитную мешалку при +4 °С. Экстракцию проводили в течение 48 ч при 80 об/мин, за это время буфер несколько раз меняли (до просветления жидкости). После этого образовавшийся гель промывали дистиллированной водой и центрифугировали. Полученный осадок состоял преимущественно из коллагена I типа. Затем осадок растворяли 0,2 М уксусной кислотой (pH 4,0) и помещали на мешалку при +4 °С еще на 48 ч. До нужной консистенции полученный гель доводили 0,2 М уксусной кислотой.

Полученный коллаген I типа наносили на поверхность контактных линз iWear dr Comfort. Для этого в стерильных условиях из контейнера с контактной линзой удаляли исходную жидкость и заполняли линзу жидким коллагеном I типа. Затем линзу, покрытую коллагеном I типа, подсушивали в ламинарном шкафу при облучении бактерицидной лампой в течение 40 мин и вместе с контейнером помещали в стерильную чашку Петри. Далее оценивали биосовместимость полученного коллагенового геля с клетками буккального эпителия.

В качестве контроля использовался коллагеновый гель для заживления роговицы глаза на основе коллагена II типа (РУ № ФСР 2009/05861, ООО «МакМеди»).

**Оценка биосовместимости коллагеновых матриц.** Культуру клеток из биоптата щечного эпителия кролика получали, используя ранее описанную нами методику [18]. Затем суспензию с клетками наносили на контактные линзы с исследуемыми коллагеновыми носителями и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>. Исследование трансплантатов проводили через 24 ч 1-й и 2-й недели после посева клеток. Анализ биологической

полноценности клеток буккального эпителия в культуре и на поверхности контактной линзы iWear dr Comfort, покрытой коллагеном, проводили при микроскопическом исследовании с использованием витального окрашивания флуорохромами — трипафлавином и акридиновым оранжевым, которые позволяют определить целостность мембран клеток, а также наличие в них секреторных везикул [18, 23]. В процессе исследования определяли долю насыщенных везикулами клеток и выражали в %.

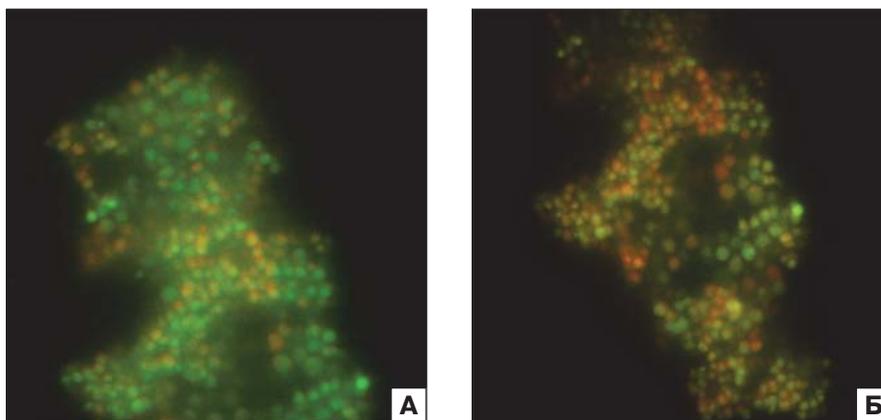
**Оценка *in vivo* реакции интактной роговицы кролика на коллагеновый матрикс.** Исследуемые материалы помещали на роговицу экспериментальных животных, изучали переносимость и биосовместимость материалов. Срок наблюдения составил 14 дней.

Исследование проводилось на 12 кроликах (24 глаза). На интактную роговицу помещали контактную линзу, покрытую исследуемым видом коллагена I типа, полученного из сухожилия кролика методом кислотной экстракции. В качестве контроля на роговицу парного глаза накладывали контактную линзу, покрытую коллагеновым гелем для заживления роговицы глаза. Проводили блефарорафию на 3 дня.

Оценку состояния глаз проводили на 3, 5, 7, 14-е сутки после трансплантации, сравнивая с контролем по следующим признакам: степень выраженности воспалительной реакции, наличие отека, наличие помутнения роговицы и его интенсивности, количество и характер отделяемого.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Оценка биосовместимости клеток буккального эпителия и коллагенов I и II типа.** Отмечено, что через 24 ч после посадки на коллагенах I и II типов клетки буккального эпителия адгезировали и образовывали крупные конгломераты (рис. 1). Клетки сохраняли свою морфологию и способность к пролиферации. Использование в работе с клетками витального флуорохромного красителя на основе трипафлавина и



**Рис. 1.** Пролиферирующие клетки на исследуемых коллагенах через 24 ч после посадки. А — клетки на коллагене I типа; Б — клетки на коллагене II типа. Окраска трипафлавином и акридиновым оранжевым. Ув. 1000.

акридинового оранжевого позволило выявить красное свечение секреторных везикул на фоне зеленого свечения ядра и остальной цитоплазмы. Выявлено, что через 24 ч после посева доля клеток, насыщенных секреторными везикулами, составила на коллагене I типа в среднем  $39,6 \pm 4,0 \%$ , на геле коллагена II типа —  $43,0 \pm 6,1 \%$ . В исходной культуре доля клеток, насыщенных секреторными везикулами, составляла в среднем  $42,8 \pm 5,0 \%$ , т. е. видимой потери секреторной активности клеток не наблюдалось.

Необходимо подчеркнуть, что длительное культивирование (до 2 нед) клеток-предшественников в присутствии коллагена I типа и коллагенового геля на основе коллагена II типа не приводило к переходу клеток в терминальную стадию дифференцирования, т. е. доля клеток, обладающих характерной для буккального эпителия распластанной формой во всех случаях не превышала 1–5%. С другой стороны, при культивировании в течение 2 нед доля активно секреторирующих клеток буккального эпителия достоверно снижалась до 25–30%. Подобное изменение процента активно секреторирующих клеток наблюдалось также при длительном культивировании в отсутствие трансплантатов.

Таким образом, коллаген I типа, полученный из сухожилий кроликов, токсического действия на клетки буккального эпителия не оказывал.

*Исследование переносимости коллагена I типа, полученного из сухожилий кроликов методом кислотной экстракции (6 кроликов, 6 глаз).* При нанесении геля коллагена I типа на роговицу в 3 случаях наблюдали инъекцию бульбарной конъюнктивы на 3-и сутки, отек роговицы на 3–7-е сутки; помутнение различной степени выраженности, обильное слизистое отделяемое на 7–14-е сутки (рис. 2). Таким образом, можно сделать вывод об агрессивном воздействии уксусной кислоты, содержащейся в геле коллагена I типа, на роговицу животного. По этой причине была произведена модификация методики его получения с дополнительным снижением концентрации уксусной кислоты. Снижение кислотности геля коллагена было достигнуто следующими способами: 1) лиофилизация коллагена: за счет испарения влаги

возможно снижение кислотности биоматериала; 2) разведение коллагенового геля с целью повышения pH.

Было изготовлено 2 вида губок из коллагена.

— № 1: в качестве сырья использовали 5% гель коллагена, полученный методом кислотной экстракции без дополнительного снижения концентрации уксусной кислоты. Однако коллаген № 1, полученный методом лиофилизации, имел выраженный запах уксуса, в связи с чем было принято решение о продолжении эксперимента с коллагеном I типа № 2.

— № 2: в качестве сырья использовали 5% гель коллагена, полученный методом кислотной экстракции с дополнительным снижением концентрации уксусной кислоты путем разведения биоматериала стандартным водным раствором хлоргексидина 0,05%. Раствор коллагена I типа с уксусной средой смешивался в равных объемах со стандартным водным раствором хлоргексидина 0,05%. Композицию лиофилизировали в лиофильной сушке. В результате получали губку из коллагена толщиной 1–2 мм, не имевшую запаха уксуса.

*Изучение переносимости роговицей кролика аппликации коллагена № 2 (6 кроликов, 6 глаз).* Из коллагена № 2, полученного методом кислотной экстракции с дополнительным снижением концентрации уксусной кислоты, выкраивались круги диаметром 10 мм, которые затем укладывались на интактную роговицу кролика, сверху укладывали контактную линзу. Коллаген принимал желеобразную консистенцию в течение 3–5 мин после аппликации. Проводили временную блефарорафию на 3 дня.

В течение всего периода наблюдения (14 дней) конъюнктивa оставалась спокойной у всех животных, роговица прозрачная, гладкая, блестящая. Таким образом, токсического или раздражающего действия коллагена I типа № 2 не наблюдалось (рис. 3).

Анализ клеток в присутствии исследуемых коллагеновых подложек (контактные линзы с коллагеном I типа кролика и с гелем коллагена II типа) показал, что эти подложки не вызывают закисления питательной среды и не оказывают токсического действия на клетки.



**Рис. 2.** Раздражающее воздействие геля коллагена I типа № 1 на роговицу. А — инъекция глазного яблока; Б — отек, помутнение роговицы; В — выраженное помутнение роговицы, слизистое отделяемое.



**Рис. 3.** Прозрачная, гладкая роговица после применения коллагена I типа № 2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что коллаген I типа, полученный методом кислотной экстракции с дополнительным снижением концентрации уксусной кислоты, является безопасным для использования в области переднего отдела глаза. Этот вид коллагенового матрикса и коллагеновый гель для заживления роговицы глаза на основе коллагена II типа нетоксичны для клеток. Клетки буккального эпителия хорошо адгезируют на данных видах подложек и могут быть полностью донесены до места применения. Таким образом, комбинированные биоконструкции на основе данных коллагеновых материалов могут быть использованы для создания биоинженерных конструкций для трансплантации клеток буккального эпителия при патологии глазной поверхности в эксперименте.

### Литература

1. Кочергин С.А., Сергеева Н.Д. Исследование статистически значимых отличий показателей качества жизни пациентов после механической травмы глаза и практически здоровых людей. *Практическая медицина*. 2012; 59: 199–203.
2. Nishida K., Yamato M., Hayashida Y., Watanabe K., Yamamoto K. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *The New England Journal of medicine*. 2004, 351 (12): 1187–96.
3. Макаров П.В., Кугушева А.Э., Ченцова Е.В., Слепова О.С. О персистирующих эрозиях роговичного трансплантата (сообщение 1). *Российский офтальмологический журнал*. 2015; 8 (1): 13–8.
4. Макаров П.В., Кугушева А.Э., Ченцова Е.В., Слепова О.С. О персистирующих эрозиях роговичного трансплантата (сообщение 2). *Российский офтальмологический журнал*. 2015; 8 (2): 41–6.
5. Флора С.В., Макаров П.В., Гундорова Р.А. О перспективах применения кросслинкинга в лечении тяжелых ожогов роговицы (пилотное экспериментальное исследование). *Российский офтальмологический журнал*. 2014; 7: 75–80.

6. Ченцова Е.В., Петриашвили Г.Г., Арутюнова И.Р. и др. Применение фетальных клеток роговицы человека для лечения различной патологии органа зрения. *Офтальмохирургия*. 1999; 4: 3–9.
7. Николаева Л.Р., Ченцова Е.В., Полтавцева Р.А., Марей М.В. Трансплантация стволовых клеток при ожогах роговицы в эксперименте. *Клиническая офтальмология*. 2005; 4: 150–2.
8. Grueterich M., Espana E.M., Tseng S.C.G. Ex Vivo expansion of limbal epithelial stem cell: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Survey of Ophthalmol*. 2003; 48 (6): 631–46.
9. Kinoshita S., Koizumi N., Nakamura T. Transplantable cultivated epithelial sheet for ocular surface reconstruction. *Experimental Eye Research*. 2004; 78: 483–91.
10. Lavker R., Tseng S., Sun T. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Experimental Eye Research*. 2004; 78: 433–46.
11. Николаева Л.Р., Ченцова Е.В. Лимбальная клеточная недостаточность. *Вестник офтальмологии*. 2006; 3: 43–7.
12. Rama P., Matuska S., Paganoni G., et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *The New England Journal of Medicine*. 2010; 363 (2): 147–55.
13. Ricardo J.R., Cristovam P.C., Filho P.A., et al. Transplantation of conjunctival epithelial cells cultivated ex vivo in patients with total limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2013; 32 (3): 221–8.
14. Priya C.G., Arpitha P., Vaishali S., et al. Adult human buccal epithelial stem cells: identification, ex-vivo expansion, and transplantation for corneal surface reconstruction. *Eye*. 2011; 25 (12): 1641–9.
15. Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C., et al. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *British Journal of Ophthalmology*. 2004; 88: 1280–4.
16. Hayashida Y., Nishida K., Yamato M., et al. Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2005; 46: 1632–9.
17. Tseng S.C. Concept and application of limbal stem cells. *Eye*. 1989; 3: 141–57.
18. Ченцова Е.В., Конюшко О.И., Макаров М.С. и др. Оптимизация метода выделения и культивирования клеток буккального эпителия на коллагеновых подложках для применения в офтальмологии. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2015; 1: 56–60.
19. Nakamura T., Endo K., Cooper L.J., et al. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2003; 44: 106–6.
20. Ермолов А.С., Смирнов С.В., Хватов В.Б. и др. Биологическая повязка для лечения ожоговых ран IIIa степени. *Хирургия*. 2008; 10: 4–9.
21. Шуклина Е.В., Сапожникова А.И. Коллаген в медицине и косметологии. *Натуральная фармакология и косметология*. 2005; 4: 29–34.
22. Мороз О.В. Современные аспекты лечения ран с использованием биологически активных повязок в офтальмохирургии. *Офтальмохирургия*. 2014; 1: 90–4.
23. Макаров М.С. Флуоресценция в исследовании клеток: пути и возможности. *Молекулярная медицина*. 2013; 4: 10–5.

# Technologies of creation, evaluation of biocompatibility and safety of the collagen matrix in the bioengineering cell construction

N.S. Egorova<sup>1</sup>, E.V. Chentsova<sup>1</sup>, S.V. Flora<sup>1</sup>, N.V. Borovkova<sup>2</sup>, O.I. Konjushko<sup>3</sup>, M.S. Makarov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Sklifosovsky Institute of Emergency Medicine, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Poliomyelitis Institute, Moscow, Russia

natalia881010@gmail.com

*Severe diseases of the anterior eye surface, such as ulcers and erosions of varied genesis, or the consequences of the cornea and conjunctiva burns are important topical issues of ophthalmology. **Purpose:** to assess the suitability of existing collagen substrates based on types I and II collagen for being used as a matrix for rabbit buccal epithelium cells. **Material and methods.** The study involved 12 rabbits (24 eyes), on whose intact cornea a contact lens was placed. The lens was covered with a variety of type I collagen which had been obtained from rabbit tendon by acid extraction. For control purposes, a contact lens covered with collagen gel based on type II collagen and designed for healing was placed on the cornea of the fellow eye. Biocompatibility and tolerability of collagen matrixes was assessed. **Results.** Type I collagen obtained from rabbit tendon had no toxic action on buccal epithelial cells. The types of collagen used were found to be an optimal medium for buccal epithelial cells, which adhere well and can be delivered to the site of corneal damage. Type I collagen, which was produced by acid extraction, had an irritating effect on the rabbit cornea, which is associated with high content of acetic acid. Therefore, the technique of producing type I collagen was modified to achieve an additional reduction of acidity. **Conclusion.** Type I collagen and collagen gel for corneal healing produced on the basis of type II collagen were shown to be safe and effective when used in bioengineering construction.*

**Keywords:** corneal damage, experimental study, work, buccal epithelium, collagen, bioengineering construction, keratoprotector Applicoll.

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

*For citations: Egorova N.S., Chentsova E.V., Flora S.V., Borovkova N.V., Konjushko O.I., Makarov M.S. Technologies of creation, evaluation of biocompatibility and safety of the collagen matrix in the bioengineering cell construction.*

*Russian ophthalmological journal. 2017; 10 (2): 71–7. (in Russian)*

doi: 10.21516/2072-0076-2017-10-2-71-77

Financial disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned

## References

1. Kochergin S., Sergeeva N. Research of statistically significant differences of quality of life parameters concerning patients after a mechanical eye injury and almost healthy people. *Prakticheskaja meditsina*. 2012; 59: 199–203 (in Russian).
2. Nishida K., Yamato M., Hayashida Y., Watanabe K., Yamamoto K. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *The New England Journal of medicine*. 2004; 351 (12): 1187–96.
3. Makarov P.V., Kugusheva A.E., Chentsova E.V., Slepova O.S. On persistent erosions of the corneal transplant (Part 1). *Russian Ophthalmological Journal*. 2015; 8 (1): 13–8 (in Russian).
4. Makarov P.V., Kugusheva A.E., Chentsova E.V., Slepova O.S. On persistent erosions of the corneal transplant (Part 2). *Russian Ophthalmological Journal*. 2015; 8 (2): 41–6 (in Russian).
5. Flora S.V., Makarov P.V., Gundorova R.A. On the prospects of cross-linking use in the treatment of severe corneal burns: an experimental pilot study. *Russian Ophthalmological Journal*. 2014; 7: 75–80 (in Russian).
6. Chentsova E.V., Petriashvili G.G., Arutjunova I.R., et al. Using of fetal human corneal cells in the treatment of various eye diseases. *Oftal'mokhirurgija*. 1999; 4: 3–9 (in Russian).
7. Nikolaeva L.R., Chentsova E.V., Poltavtseva R.A., Marey M.V. Transplantation of ectodermal stem cells in corneal burns in experiment. *Klinicheskaya oftal'mologija*. 2005; 4: 150–2 (in Russian).
8. Grueterich M., Espana E.M., Tseng S.C.G. Ex Vivo expansion of limbal epithelial stem cell: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Survey of Ophthalmol*. 2003; 48 (6): 631–46.
9. Kinoshita S., Koizumi N., Nakamura T. Transplantable cultivated epithelial sheet for ocular surface reconstruction. *Experimental Eye Research*. 2004; 78: 483–91.
10. Lavker R., Tseng S., Sun T. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Experimental Eye Research*. 2004; 78: 433–46.
11. Nikolaeva L.R., Chentsova E.V. Limbic cellular insufficiency. *Vestnik oftal'mologii*. 2006; 3: 43–7 (in Russian).
12. Rama P., Matuska S., Paganoni G., et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *The New England Journal of Medicine*. 2010; 363 (2): 147–55.
13. Ricardo J.R., Cristovam P.C., Filho P.A., et al. Transplantation of conjunctival epithelial cells cultivated ex vivo in patients with total limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2013; 32 (3): 221–8.
14. Priya C.G., Arpitha P., Vaishali S., et al. Adult human buccal epithelial stem cells: identification, ex-vivo expansion, and transplantation for corneal surface reconstruction. *Eye*. 2011; 25 (12): 1641–9.

15. Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C., et al. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *British Journal of Ophthalmology*. 2004; 88: 1280–4.
16. Hayashida Y., Nishida K., Yamato M., et al. Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2005; 46: 1632–9.
17. Tseng S.C. Concept and application of limbal stem cells. *Eye*. 1989; 3: 141–57.
18. Chentsova E.V., Konjushko O.I., Makarov M.S., et al. Optimization of the method of getting and cultivation of buccal epithelial cells on the collagen substrates for use in ophthalmology. *Stem cell technology in biology and medicine*. 2015; 1: 56–60 (in Russian).
19. Nakamura T., Endo K., Cooper L.J., et al. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2003; 44: 106–6.
20. Ermolov A., Smirnov S., Hvatov V. et al. Biological dressing for the treatment of IIIa degree burn wounds. *Khirurgija*. 2008; 10: 4–9.
21. Shchukina E.V., Sapozhnikova A.I. Collagen in medicine and cosmetology. *Natural Pharmacology and cosmetology*. 2005; 4: 29–34 (in Russian).
22. Moroz O.V. Modern aspects of wounds treatment using biologically active bandages in ophthalmic surgery. *Oftal'mokhirurgija*. 2014; 1: 90–4 (in Russian).
23. Makarov M.S. Fluorescence in cell research: approaches and possibilities. *Molecular medicine*. 2013; 4: 10–5 (in Russian).

Адрес для корреспонденции: 105062 Москва, ул. Садовая-Черногрязская, д. 14/19; ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России  
natalia881010@gmail.com