

DOI:10.23873/2074-0506-2017-9-3-226-235

Репаративный эффект биоконструкции на основе коллагена I типа и клеток буккального эпителия при лечении глубоких дефектов роговицы в эксперименте

Н.С. Егорова¹, Е.В. Ченцова¹, Н.В. Боровкова², М.С. Макаров², М.В. Сторожева²

¹ ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» МЗ РФ, Москва, Россия;

² ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», Москва, Россия

Контактная информация: Наталья Сергеевна Егорова, аспирант Московского НИИ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия, e-mail: natalia881010@gmail.com

Дата поступления статьи: 28.04.2017

Цель работы: исследовать влияние биоконструкции на основе коллагена I типа и клеток буккального эпителия на репаративные процессы в роговице кроликов после экспериментальной кератэктомии на разных этапах лечения (3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки).

Материал и методы. Исследование проведено на 20 кроликах породы шиншилла, на 40 глазах которых выполнена дозированная кератэктомия с формированием эпителиально-стромального дефекта роговицы. На роговицы опытных глаз помещали биоконструкцию с клетками буккального эпителия на матриксе из коллагена I типа. Роговицы контрольных глаз укрывали мягкой контактной линзой. После завершения операции на всех глазах проводили временную блефарорафию на 3 суток. Оценивали скорость сокращения дефектов роговицы. Макро- и микроскопическую оценку эффективности проводимой терапии осуществляли на 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки эксперимента.

Результаты. При использовании биоконструкции с клетками буккального эпителия длительность полной эпителизации дефекта роговицы сокращается в среднем на 7 суток относительно результатов в группе сравнения. Предложенная биоконструкция ускоряет миграцию и пролиферацию клеток на ранних стадиях репарации (3–7 суток после начала лечения), а также уменьшает выраженность воспалительной реакции.

Заключение. Биоконструкция с клетками буккального эпителия на матриксе из коллагена I типа показала свою эффективность в лечении поврежденных роговицы.

Ключевые слова: повреждение роговицы, экспериментальное исследование, буккальный эпителий, биоконструкция

Егорова Н.С., Ченцова Е.В., Боровкова Н.В. и др. Репаративный эффект биоконструкции на основе коллагена I типа и клеток буккального эпителия при лечении глубоких дефектов роговицы в эксперименте. Трансплантология. 2017;9(3):226–235. DOI:10.23873/2074-0506-2017-9-3-226-235

Experimental repair of deep corneal defects using a bio-construct comprising a collagen type I matrix loaded with buccal epithelial cells

N.S. Egorova¹, E.V. Chentsova¹, N.V. Borovkova², M.S. Makarov², M.V. Storozheva²

¹ Moscow Helmholtz's Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia;

² N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russia

Correspondence to: Natal'ya S. Egorova, Postgraduate Student at Moscow Helmholtz's Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia, e-mail: natalia881010@gmail.com

Received: 28 April 2017

The research **objective** was to study the reparative effects of the collagen type I bio-construct loaded with buccal epithelial cells, on the rabbit cornea after experimental keratectomy at various stages of treatment (on the 3rd, 7th, 14th, 30th days).

Material and methods. The experiments were conducted on 20 rabbits of the Chinchilla breed that were operated on cornea of both eyes aiming to inflict epithelial and stromal cornea defects. The collagen-based bio-construct bearing buccal epithelial cells was placed over the cornea of the experimental eyes. The cornea of the control eyes was covered with smooth contact lens. After the surgery, a temporal blepharorrhaphy was performed and kept for 3 days. We studied macro- and microscopic pattern of corneal regeneration at 3, 7, 14, and 30 days of experiment.

Results. When using the collagen-based bio-construct containing buccal epithelial cells, the complete epithelialization of the corneal defect occurred at mean 7 days earlier compared to that in the control eyes. Thus, the offered bio-construct stimulated the cell migration and proliferation at early stages of treatment (3–7 days) reducing the inflammation activity.

Conclusion. The bio-construct comprising a collagen type I matrix loaded with buccal epithelial cells can provide an effective treatment option for corneal defects.

Keywords: corneal defect, experimental study, buccal epithelium, collagen, bio-construct

Egorova N.S., Chentsova E.V., Borovkova N.V., et al. Experimental repair of deep corneal defects using a bio-construct comprising a collagen type I matrix loaded with buccal epithelial cells. *Transplantologiya*. 2017;9(3):226–235. (In Russian). DOI:10.23873/2074-0506-2017-9-3-226-235

Актуальность оптимизации лечения одной из наиболее часто встречающихся патологий переднего отрезка глаза, а именно эрозий и язв роговицы различной этиологии, обусловлена, прежде всего, частотой развития таких осложнений, как возникновение рецидивирующей эрозии, десцеметоцеле, перфорация роговицы, формирование стойкого помутнения и т.д., часто приводящих к инвалидизации [1, 2]. В настоящее время наиболее перспективным направлением в лечении патологии роговицы представляется трансплантация прогениторных клеток [3]. В 2003 г. Nakamura и Kinoshita в эксперименте продемонстрировали высокий регенераторный потенциал культивированных клеток буккального эпителия при его трансплантации на поврежденную роговицу [4–7]. Отмечено, что клетки буккального эпителия поддерживали пролиферативную активность собственной ткани роговицы без стимуляции кератинизации. Даже при небольших сроках экспозиции культивированного аллогraftа слизистой щеки происходило достоверное ускорение процессов регенерации ткани роговицы [8, 9]. Однако остается нерешенным вопрос о методе доставки клеток буккального эпителия и их удержания в месте дефекта. Наиболее рациональным решением этого вопроса может служить разработка биоконструкции, содержащей матрикс-носитель и клетки.

Оптимальным носителем для клеток могут служить коллагенсодержащие матриксы [10, 11]. К достоинствам коллагеновых матриксов относятся эластичность, прочность, биodeградируемость, высокая способность привлекать и удерживать адгезирующие клетки, а также их микровезикулы [12]. Среди коллагеновых трансплантатов широко известны повязки на основе коллагена I типа, которые на фоне простоты и дешевизны их изготовления обладают выраженными репаративными свойствами, особенно в комбинации с клеточным материалом. Репаративный эффект коллагеновых повязок с клетками проявляется при лечении ожоговых и укушенных ран и некоторых трофических язв [12–14]. Есть основания считать, что аналогичные биотрансплантаты будут также эффективны для стимуляции регенерации поврежденной роговицы, в то же время такой способ лечения требует значительной оптимизации.

Целью настоящей работы было исследовать влияние биоконструкции на основе коллагена I типа и клеток буккального эпителия на репаративные процессы в роговице кроликов после

экспериментальной кератэктомии на разных этапах лечения.

Материал и методы

Для эксперимента использованы лабораторные животные – кролики породы шиншилла массой тела 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».

Клиническую эффективность и регенеративное действие биоконструкции исследовали на модели кератэктомии у кроликов. На 40 глазах 20 кроликов после удаления третьего века проведена дозированная кератэктомия диаметром 8 мм; толщина удаляемого лоскута роговицы составила около 160 микрон. Далее на поврежденную роговицу правого глаза каждого кролика помещали разработанную биоконструкцию с клетками буккального эпителия на матриксе из коллагена I типа. Роговицу парного левого глаза укрывали мягкой контактной линзой. После завершения операции на всех глазах проводили временную блефарорафию на 3 суток.

Глаза после трансплантации биоконструкции составляли опытную группу (20 глаз), глаза с покрытием мягкой контактной линзой использовали в качестве группы сравнения (20 глаз). В послеоперационном периоде как в опытный, так и в контрольный глаза каждого животного проводили инстилляцию антибактериального препарата (капли Офтаквикс по 1 капле 3 раза в сутки) в течение 10 дней.

После снятия швов оценивали размеры и глубину дефекта роговицы, а также скорость его сокращения относительно данных группы сравнения. Срок наблюдения составил 30 суток. Макро- и микроскопическую оценку эффективности проводимой терапии осуществляли на 3-и, 7-е, 14-е и 30-е сутки эксперимента. Макроскопически определяли размер и глубину дефекта роговицы, сравнивали скорость сокращения дефекта между группами. Для микроскопического анализа роговицы образцы глаз животных фиксировали 10% формалином, изготавливали стандартные гистологические препараты, окрашивали их гематоксилином и эозином, а затем ана-

лизировали с помощью светового микроскопа. Оценивали состояние коллагеновых волокон, инфильтрацию клетками воспаления, эпителизацию. Структурную целостность коллагеновых волокон роговицы оценивали также по уровню их автофлюоресценции в гистологических препаратах с помощью флюоресцентной микроскопии (λ возбуждения = 510–560 нм, λ эмиссии – от 575 нм, экспозиция – 1 секунда) [15].

В лечении кроликов использована разработанная оригинальная биоконструкция на основе коллагена I типа с клетками буккального эпителия. Биоконструкция включала три части:

- подложка – мягкая контактная линза iWear dr Comfort;

- матрикс-носитель из коллагена кролика I типа. Коллаген получали из сухожилий кролика методом кислотной экстракции, затем для снижения концентрации уксусной кислоты биоматериал разводили стандартным водным 0,05% раствором хлорексидина, лиофилизировали и стерилизовали путем ультрафиолетового облучения. В результате получали губку толщиной 1–2 мм, которую укладывали на контактную линзу;

- культивированные клетки буккального эпителия кролика. Концентрированную суспензию с клетками (1 млн/мл в изотоническом 0,9% растворе хлористого натрия) наносили на контактные линзы с коллагеновым матриксом в объеме 1–2 мл, после чего биоконструкцию сразу выдавали для использования [16].

Результаты исследования

При анализе результатов экспериментального клинического исследования по влиянию созданной биоконструкции на процессы регенерации поврежденной роговицы на модели кератэктомии у кроликов получены следующие результаты.

На 3-и сутки после проведения кератэктомии на опытных глазах и глазах группы сравнения отмечали признаки воспаления, такие как гиперемия конъюнктивы, скудное слизистое отделяемое, отек роговицы 1–2-й степени. Площадь эрозии в опытной группе была статистически значительно меньше, чем в контроле, и составляла $24,48 \pm 2,18$ мм² против $32,92 \pm 2,64$ мм² ($t_{эмп} = 2,3$ при $p < 0,05$). При этом в одном из глаз опытной группы отсутствовало прокрашивание дефекта флюоресцеином.

На 7-е сутки наблюдения воспаление купировано на всех глазах. В опытной группе на 5 глазах

из 15 сохранялся остаточный дефект площадью в среднем $3,73 \pm 1,46$ мм². На остальных 10 глазах имела место полная эпителизация, причем на 2 глазах из них роговица приобрела исходные характеристики прозрачности и гладкости. В группе сравнения дефект сохранялся на 11 глазах из 15, его средняя площадь составила $6,22 \pm 2,21$ мм². На одном из глаз данной группы наблюдалась шероховатость эпителия в области дефекта. Отметим, что вероятность наступления эпителизации в опытной группе статистически значительно выше, чем в группе сравнения ($\chi^2 = 4,821$ при $p < 0,05$).

На 14-е сутки площадь остаточного дефекта роговицы в опытной группе составляла $1,334 \pm 0,035$ мм², при этом полная эпителизация наблюдалась на 6 глазах из 10. На 2 глазах выявлено формирование нежного облаковидного помутнения (2–3-я степень по шкале Войно-Ясенецкого). В группе сравнения только 4 глаза из 10 были полностью эпителизованы, на остальных средняя площадь дефекта составила $4,75 \pm 0,1$ мм². При этом на 2 глазах обнаружен рецидив эрозии роговицы. На 6 глазах из 10 выявлено формирование облаковидного помутнения (3–4-я степень по шкале Войно-Ясенецкого).

На 30-е сутки наблюдения в опытной группе (5 глаз) в одном случае отмечен рецидив эрозии с площадью дефекта $0,78$ мм² и в 3 случаях – формирование нежного облаковидного помутнения (2–3-я степень по шкале Войно-Ясенецкого). В группе сравнения (5 глаз) дефект роговицы площадью $3,14$ мм² сохранялся на 1 глазу. Помутнение роговицы 3–4-й степени по шкале Войно-Ясенецкого выявлено на 3 глазах.

На гистологических препаратах через 3 суток ($n = 5$) в группе сравнения непрерывный эпителий отсутствовал у всех животных, по краям раны в 4 случаях из 5 эпителий содержал только 1 слой клеток (рис. 1), на большом протяжении роговицы на 2 глазах наблюдалось формирование базальной мембраны. В дне раны отмечены отек и эозинофилия коллагеновых волокон межклеточного матрикса, интенсивная инфильтрация клетками воспаления, преимущественно нейтрофилами и эозинофилами, на фоне низкой миграционной активности кератоцитов. В опытной группе на 1 глазу эпителиальный слой выявлен по всей длине роговицы, на 2 глазах – эпителий по краям раны имел 2–3 слоя клеток (рис. 2). Также в 3 случаях из 5 в роговице отмечалась интенсивная миграция кератоцитов со слабо конденсированным хроматином (синтетически

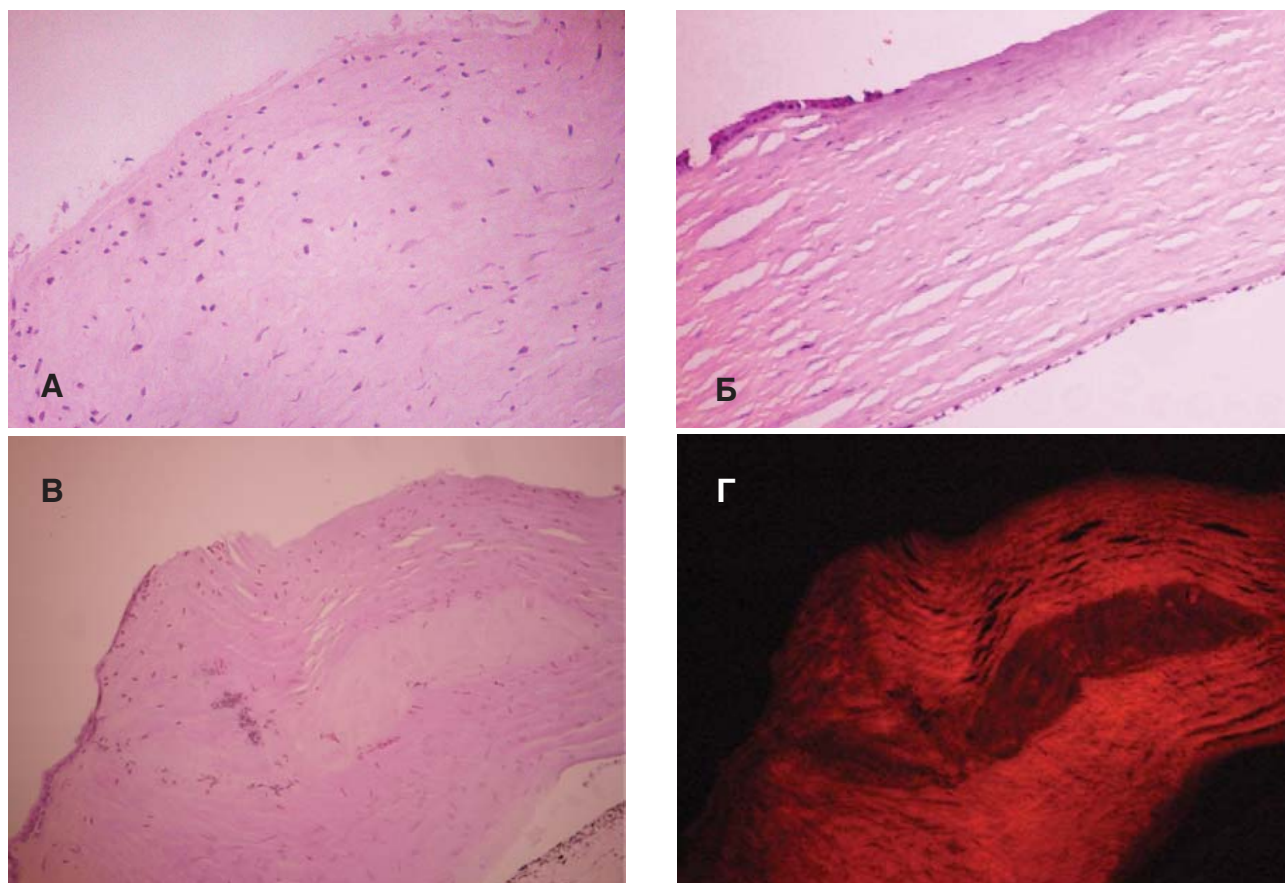


Рис. 1. Гистологическая картина дефекта роговицы через 3 суток эксперимента в группе сравнения: А – дно дефекта, инфильтрация клетками воспаления; Б – край дефекта, один слой эпителия, эозинофилия волокон; В – отек стромы; Г – автофлуоресценция коллагеновых волокон стромы, отек. Окраска гематоксином и эозином. Увеличение x 200

активные клетки); как правило, миграция шла вдоль глубоко лежащих волокон и десцеметова слоя (рис. 2Б). Отечность волокон роговицы в опытных глазах была ниже, чем в группе сравнения, в то же время, как и в группе сравнения, наблюдались волокна с выраженной эозинофилией. Повышенная эозинофилия коллагена роговицы не связана с его декомпактизацией – в обеих группах эозинофильные волокна имели такой же уровень автофлуоресценции, что и нормально окрашенные волокна, тогда как у волокон с выраженным отеком этот показатель значимо снижался. В целом общий рисунок межклеточных волокон стромы в области экспериментальной кератэктомии просматривался менее отчетливо, чем в областях без повреждений.

Через 7 суток формирование непрерывного эпителия на роговице отмечено на 1 глазу в группе сравнения и 3 глазах в опыте, и только в 1 случае в опытной группе эпителий имел 3–4 слоя и

нормальную ориентацию клеток в их составе. У всех животных с полной эпителизацией выявлены зоны, в которых количество слоев эпителиальных клеток было выше нормы и можно было наблюдать поверхностные эпителиальные пролифераты (рис. 3). В опытной группе эпителиальные пролифераты отмечались также в строме (погруженные пролифераты), что указывает на более высокую интенсивность эпителиального роста по сравнению с таковым в группе сравнения (см. рис. 3Б). Сохранялась инфильтрация клетками воспаления (преимущественно эозинофилами), но в опытной группе уровень инфильтрации был ниже, чем в группе сравнения. В обеих группах наблюдалась миграция кератоцитов, главным образом в наружных слоях стромы (рис. 4). При этом как в опытных, так и в глазах группы сравнения наблюдались отек и нарушение ориентации коллагеновых волокон.

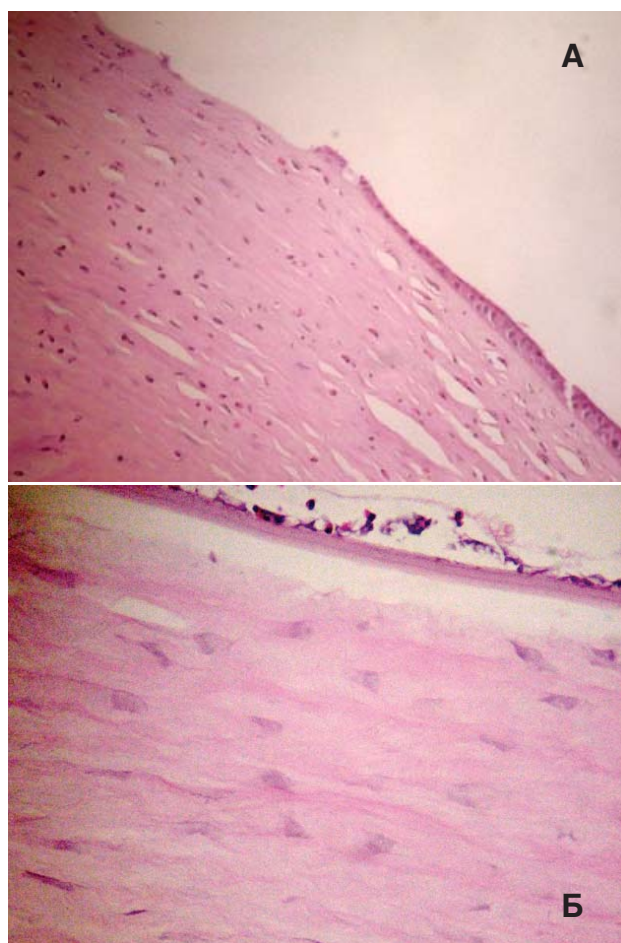


Рис. 2. Гистологическая картина дефекта роговицы через 3 суток эксперимента в опытной группе: А – край дефекта, 2–3 слоя эпителия; Б – миграция недифференцированных кератоцитов в строме. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200

Через 14 суток, как и на 7-е сутки, в опытных глазах и глазах группы сравнения в эпителиальном слое отчетливо выявлялись поверхностные пролифераты с увеличенным количеством клеток, погруженные пролифераты отсутствовали (рис. 5). Роговица в области кератэктомии была покрыта непрерывным эпителием, при этом в большинстве случаев волокна стромы, прилегающие непосредственно к эпителию, были заметно тоньше, чем в норме, что являлось predisposing фактором для отслоения эпителия. Подобная истонченность волокон отмечена у всех животных группы сравнения и в 3 случаях из 5 в опытной группе. Кроме того, на всех препаратах по-прежнему выявлялись отечные волокна. На 2 опытных глазах отмечены полностью нормальная архитектура межклеточного матрикса стромы и нормальное расположение кератоцитов.

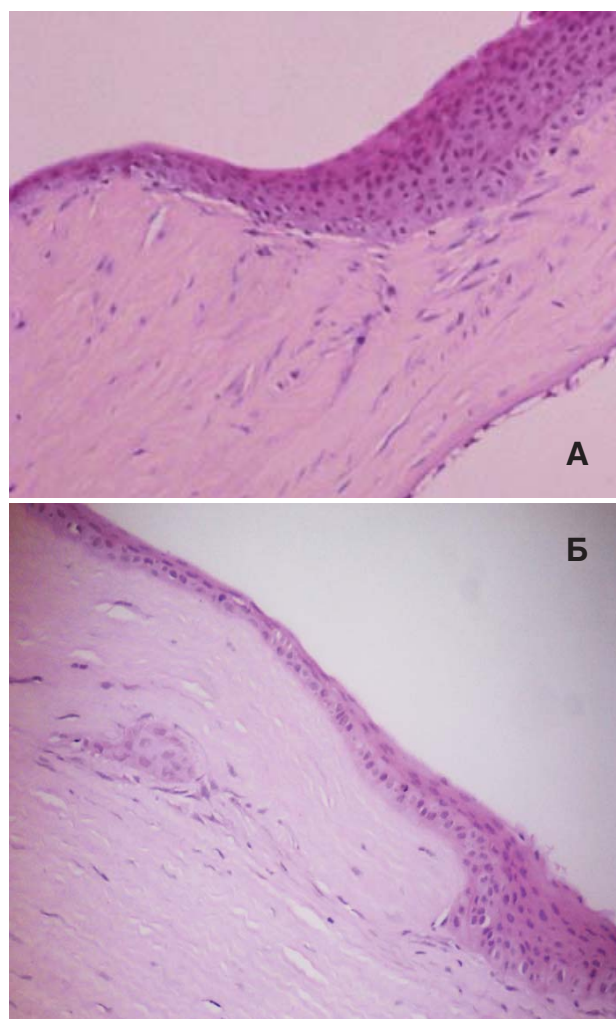


Рис. 3. Формирование многослойного эпителия в роговице через 7 суток эксперимента в глазу группы сравнения (А) и глазу опытной группы (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200

Миграционная активность клеток (в том числе со слабоконденсированным хроматином) в опытной группе к этому сроку наблюдения снижалась, что свидетельствовало о завершении процесса репарации стромы. В группе сравнения, напротив, отмечали увеличение миграции клеток, преимущественно в наружных слоях стромы.

Через 30 суток роговица была покрыта непрерывным эпителием (рис. 6) у 4 животных и в группе сравнения, и в опытной; в обеих группах на 1 глазу выявлены области, где эпителий роговицы отсутствовал (контроль) или наблюдалось его отслоение (опыт). При этом необходимо отметить, что у большинства животных на фоне полной эпителизации роговица имела выраженную неоднородность рельефа своей поверхности (см.

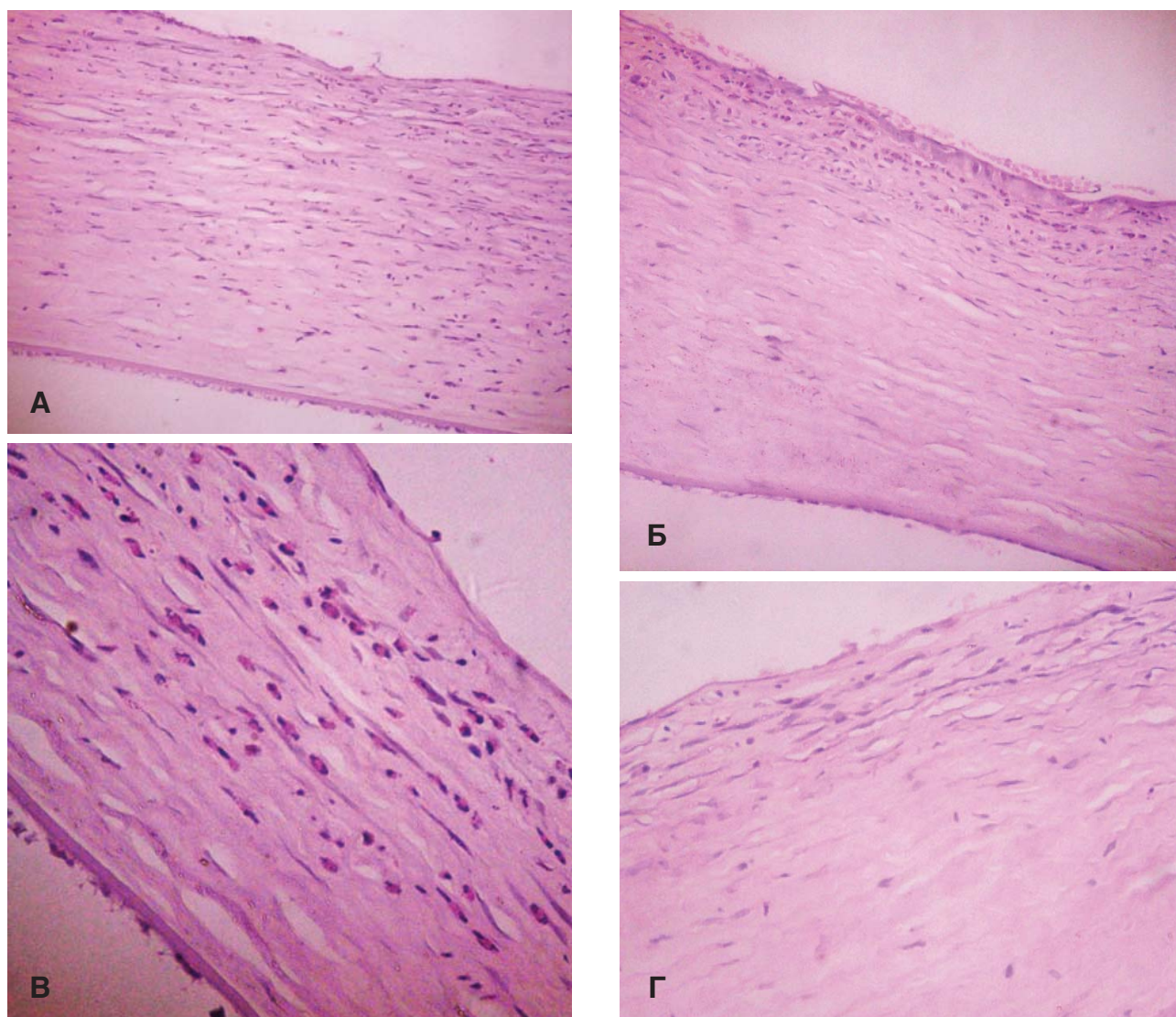


Рис. 4. Инфильтрация клетками воспаления и миграция кератоцитов на 7-е сутки эксперимента: А – глаз группы сравнения; Б – опытный глаз (увеличение $\times 200$); В – глаз группы сравнения; Г – опытный глаз (увеличение $\times 400$). Окраска гематоксилином и эозином

рис. 6А): такая «бугристость» образована за счет выпячивания эпителия и стромы или наличия поверхностных эпителиальных пролифератов. Выраженные эпителиальные пролифераты отмечены на 3 глазах в группе сравнения и на 1 глазу в опыте (где также имело место отслоение эпителия). Подлежащие волокна стромы были истончены, как и на предыдущих стадиях (7–14 суток), отек стромы сохранялся на всех глазах группы сравнения и на 3 опытных глазах. В целом нормальная организации стромы роговицы отмечена только на 2 глазах опытной группы, у остальных архитектура межклеточных волокон и ориентация клеток еще не соответствовали норме

полностью. Инфильтрация клетками воспаления наблюдалась в области контакта роговицы с конъюнктивой.

Проведенное исследование показывает, что предложенная биоконструкция ускоряет миграцию и пролиферацию клеток на ранних стадиях репарации (3–7 суток после начала лечения), а также уменьшает выраженность воспалительной реакции. Это может происходить под действием цитокинов, выделившихся из клеток буккального эпителия. При этом максимальная активность репарационных процессов роговицы отмечена в глазах опытной группы на 7-е сутки, а в глазах группы сравнения – на 14-е сутки.

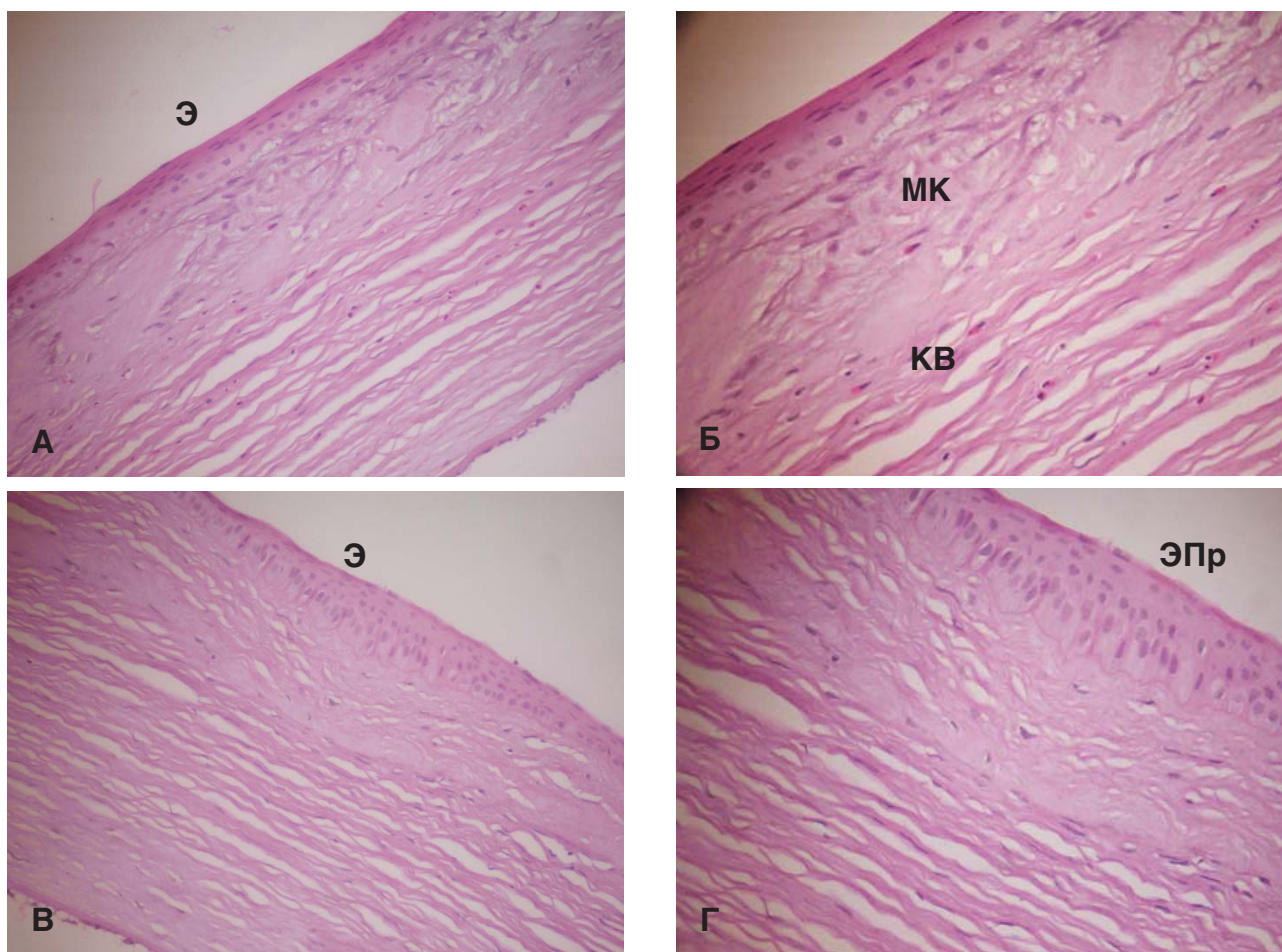


Рис. 5. Гистологическая картина дефекта роговицы через 14 суток эксперимента: А – группа сравнения (увеличение x 200); Б – группа сравнения (увеличение x 400); В – опытная группа (увеличение x 200); Г – опытная группа (увеличение x 400). Окраска гематоксилином и эозином

Примечание: Э – эпителий; ЭПр – эпителиальный пролиферат; КВ – клетки воспаления; МК – миграция кератоцитов.

Отметим, что биоконструкция контактирует с глазом лишь непродолжительное время, и клетки буккального эпителия дают выраженный, но непродолжительный эффект, который сглаживается на более поздних сроках. Также выявлено, что формирование непрерывного эпителия шло явно быстрее, чем восстановление подлежащей стромы. В результате у большинства животных помимо отека в строме были выявлены незрелые коллагеновые волокна. По всей видимости, именно наличие таких неполноценных волокон в слоях, прилегающих к эпителию, и создает риск развития рецидивов. В литературе описано, что трансплантаты, насыщенные гормонами или компонентами культивируемых клеток, в 2 раза сокращают сроки эпителизации дефекта роговицы; с другой стороны, в этих исследованиях никак не описывается состояние подлежащей

стромы. Судя по всему, именно восстановление нормальной топографии и архитектуры стромы необходимо для полноценного устранения дефекта роговицы. Эпителий, благодаря высокому пролиферативному потенциалу его клеток, способен активно наращивать объем и заполнять открытые зоны стромы, поэтому в процессе репарации роговицы необходимо добиваться в первую очередь восстановления ее субэпителиальных слоев. Поверхностные эпителиальные пролифераты (с увеличенным количеством клеток) отмечены у многих животных и на 30-е сутки исследования. Вероятно, на макроуровне их наличие может проявляться в виде помутнения разной степени выраженности. Нельзя исключить, что присутствие эпителиальных пролифератов в роговице носит лишь временный характер, и они исчезнут на более поздних сроках после травмы.

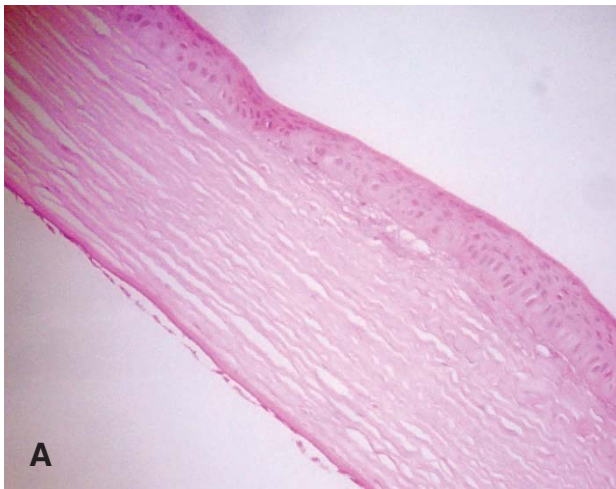


Рис. 6. Гистологическая картина роговицы через 30 суток после начала лечения: А – группа сравнения; Б – опытная группа. Окраска гематоксилином и эозином (слева). Увеличение $\times 200$

Заключение

Разработанная биоконструкция на основе коллагена и буккального эпителия стимулирует репаративные процессы в роговице на ранних сроках лечения. Остается вопрос, насколько этот эффект является пролонгированным. Вероятно, для повышения эффективности лечения недостаточно однократного нанесения биоконструкции, и требуются повторные аппликации. Отработка методики лечения глубоких дефектов роговицы с помощью клеточно-тканевых трансплантатов является задачей будущих исследований.

Выводы

1. Предложенная биоконструкция на основе коллагена I типа с клетками буккального эпителия значительно ускоряет репарацию дефекта роговицы на ранних стадиях лечения (3-и-14-е сутки). У животных опытной группы в течение 3-14 суток площадь остаточного дефекта роговицы была в 1,5-3,5 раза ниже, чем в группе сравнения, наблюдалась меньшая отечность волокон стромы и ее инфильтрация клетками воспаления.
2. Использование биоконструкции уменьшает интенсивность помутнения роговицы на 14-30-е сутки лечения.
3. Для эффективной регенерации роговицы необходимо параллельное восстановление эпителиальной выстилки и подлежащих волокон стромы. Рецидив эрозии роговицы может быть обусловлен низкой скоростью регенерации стромы.
4. Необходимо исследовать репаративный и регенеративный эффект предложенной биоконструкции при повторных аппликациях.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов
The authors state there are no conflicts of interest to declare*

Литература

1. Ермолов А.С., Смирнов С.В., Хватов В.Б. и др. Биологическая повязка для лечения ожоговых ран IIIа степени. Хирургия. 2008;(10):4–9.
2. Гундорова Р.А. История научных исследований по диагностике, хирургическому и медикаментозному лечению патологии роговицы. Практическое руководство. М., 2014: 41–42.
3. Сухих Г.Т., Николаева Л.Р., Ченцова Е.В. и др. Трансплантация стволовых клеток при ожогах роговицы в эксперименте. РМЖ. Клиническая офтальмология. 2005;(4):150–152.
4. Kinoshita S., Koizumi N., Nakamura T. Transplantable cultivated epithelial sheet for ocular surface reconstruction. Exp. Eye research. 2004;78(3):483–491. PMID:15106927
5. Nakamura T., Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. Cornea. 2003;22(7Suppl):S75–S80. PMID:14703711
6. Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C., et al. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. Br. J. Ophthalmol. 2004;88(10):1280–1284. DOI:10.1136/bjo.2003.038497
7. Priya 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):1641–1649. DOI:10.1038/eye.2011.230
8. Джамбинова Н.С., Гусева М.Р., Ганковская Л.В. и др. Цитокиноterapia «Суперлимфом» и кератопротекция «Апликоллом» в улучшении регенерации роговицы при травматическом кератите (экспериментальное исследование). Российская педиатрическая офтальмология. 2008;(3):42–44.
9. Гусева М.Р., Бадинова Н.С., Беспляева М.Б. и др. Научно-практический анализ травм глаз у детей по данным глазного стационара Морозовской детской клинической городской больницы. Российская педиатрическая офтальмология. 2008;(2):6–10.
10. Бегма А.Н., Бегма И.В., Хомякова Е.К. Опыт применения коллагеновых повязок и губок Метуракол в хирургической практике. РМЖ. 2014;22(17):1248–1252.
11. Мороз О.В. Современные аспекты лечения ран с использованием биологически активных повязок в офтальмохирургии. Офтальмохирургия. 2014;(1):90–94.
12. Клюквин И.Ю., Филиппов О.П., Васина Т.А. и др. Применение повязок на основе коллагена I типа и мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток в комплексном лечении больного с травматическим дефектом мягких тканей. Трудный пациент. 2013;11(5):22–24.
13. Смирнов С.В., Киселев И.В., Васильев А.В., Терских В.В. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов. Хирургия. 2003;(12):58–65.
14. Канюков В.Н., Стадников А.А., Трубина О.М., Яхина О.М. Клинико-морфологические аспекты применения наноструктурированного биоматериала на основе гиалуроновой кислоты при ожогах роговицы. Бюллетень СО РАМН. 2014;34(3):37–41.
15. Макаров М.С. Флюоресценция в исследовании клеток: пути и возможности. Молекулярная медицина. 2013;(4):10–15.
16. Ченцова Е.В., Конюшко О.И., Макаров М.С. и др. Оптимизация метода выделения и культивировании клеток буккального эпителия на коллагеновых подложках для применения в офтальмологии. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2015;(1):56–60.

References

1. Ermolov A.S., Smirnov S.V., Khvatov V.B. et al. Treatment of IIIa grade burns with the biological band. *Khirurgiya*. 2008;(10):4–9. (In Russian).
2. Gundorova R.A. *The history of scientific research on diagnostics, surgical and medicamentous treatment of corneal pathology. A Practical Guide*. Moscow, 2014. 41–42. (In Russian).
3. Sukhikh G.T., Nikolaeva L.R., Chentsova E.V., et al. Transpalantation of stem cells in corneal burns in experiment. *RMJ Clinical Ophthalmology*. 2005;(4):150–152. (In Russian).
4. Kinoshita S., Koizumi N., Nakamura T. Transplantable cultivated epithelial sheet for ocular surface reconstruction. *Exp Eye Res*. 2004;78(3):483–491. PMID:15106927
5. Nakamura T., Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea*. 2003;22(7 Suppl):S75–S80. PMID:14703711
6. Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C., et al. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(10):1280–1284. DOI:10.1136/bjo.2003.038497
7. Priya 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):1641–1649. DOI:10.1038/eye.2011.230
8. Dzhambinova N.S., Guseva M.R., Gankovskaya L.V., et al. Cytokinotherapy "Superlimphom" and keratoprotection "Applicolom" in improving the regeneration of the cornea in traumatic keratitis (experimental study). *Russian Pediatric Ophthalmology*. 2008;(3):42–44. (In Russian).
9. Guseva M.R., Badinova N.S., Beslaneva M.B., et al. The scientific and practical analysis of eye injuries in children according to the data of the eye hospital of the Morozov Children's Clinical City Hospital. *Russian Pediatric Ophthalmology*. 2008;(2):6–10. (In Russian).
10. Begma A.N., Begma I.V., Khomyakova E.K. Experience in the use of collagen dressings and sponges Meturacol in surgical practice. *RMJ*. 2014;22(17):1248–1252. (In Russian).
11. Moroz O.V. Modern aspects of wound treatment using biologically active bandages in ophthalmosurgery. *The Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2014;(1):90–94. (In Russian).
12. Klyukvin I.Yu., Filippov O.P., Vasina T.A., et al. Bandages based on the type I collagen and multipotent mesenchymal stem cells in combined treatment of traumatic soft tissue defects. *Difficult Patient*. 2013;11(5):22–24. (In Russian).
13. Smirnov S.V., Kiselev I.V., Vasil'ev A.V., Terskikh V.V. Modern methods of cell therapy in the treatment of burns. *Khirurgiya*. 2003;(12):58–65. (In Russian).
14. Kanyukov V.N., Stadnikov A.A., Trubina O.M., Yakhina O.M. Clinical and morphological aspects of application of hyaluronic acid nanostructured biomaterial at corneal burns. *Byulleten' SO RAMN*. 2014;34(3):37–41. (In Russian).
15. Makarov M.S. Fluorescence in cell research: approaches and possibilities. *Molecular medicine*. 2013;(4):10–15. (In Russian).
16. Chentsova E.V., Konyushko O.I., Makarov M.S., et al. Optimization of isolation and culture of buccal epithelium cells on collagen substrates for use in ophthalmology. *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2015;(1):56–60. (In Russian).